

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität
in Marburg

Komm. Direktor: Prof. Dr. med. H. Kaffarnik

ÜBER DIE HALTBARKEIT VON
PLASMALIPOPROTEINEN BEI LAGERUNG IN
TEMPERATUREN UNTER DEM GEFRIERPUNKT

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde

dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

PETER SPERLING

aus Schöningen

Marburg 1977

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität
in Marburg

Komm. Direktor: Prof. Dr. med. H. Kaffarnik

ÜBER DIE HALTBARKEIT VON
PLASMALIPOPROTEINEN BEI LAGERUNG IN
TEMPERATUREN UNTER DEM GEFRIERPUNKT

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde

dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

PETER SPERLING

aus Schöningen

Marburg 1977

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg



Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am 23.09.1977

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches

Dekan: Prof. Dr. med. H. Oepen

Referent: Prof. Dr. med. H. Kaffarnik

Correferent: Prof. Dr. med. dent. H. Bernhardt

1.	Einleitung	1
2.	1.1. Die Bedeutung der Dankbarkeit	2
3.	1.2. Die Bedeutung der Dankbarkeit für die Gesundheit	3
4.	1.3. Die Bedeutung der Dankbarkeit für die Beziehungen zu anderen	4
5.	1.4. Die Bedeutung der Dankbarkeit für die eigene Entwicklung	5
6.	1.5. Die Bedeutung der Dankbarkeit für die Gesellschaft	6
7.	2. Die Eltern in der Dankbarkeit	7
8.	2.1. Die Eltern als Vorbild	8
9.	2.2. Die Eltern als Unterstützer	9
10.	2.3. Die Eltern als Berater	10
11.	2.4. Die Eltern als Helfer	11
12.	2.5. Die Eltern als Begleiter	12
13.	2.6. Die Eltern als Zeugen	13
14.	2.7. Die Eltern als Richter	14
15.	2.8. Die Eltern als Helfer	15
16.	2.9. Die Eltern als Begleiter	16
17.	2.10. Die Eltern als Zeugen	17
18.	2.11. Die Eltern als Richter	18
19.	2.12. Die Eltern als Helfer	19
20.	2.13. Die Eltern als Begleiter	20
21.	2.14. Die Eltern als Zeugen	21
22.	2.15. Die Eltern als Richter	22
23.	2.16. Die Eltern als Helfer	23
24.	2.17. Die Eltern als Begleiter	24
25.	2.18. Die Eltern als Zeugen	25
26.	2.19. Die Eltern als Richter	26
27.	2.20. Die Eltern als Helfer	27
28.	2.21. Die Eltern als Begleiter	28
29.	2.22. Die Eltern als Zeugen	29
30.	2.23. Die Eltern als Richter	30
31.	2.24. Die Eltern als Helfer	31
32.	2.25. Die Eltern als Begleiter	32
33.	2.26. Die Eltern als Zeugen	33
34.	2.27. Die Eltern als Richter	34
35.	2.28. Die Eltern als Helfer	35
36.	2.29. Die Eltern als Begleiter	36
37.	2.30. Die Eltern als Zeugen	37
38.	2.31. Die Eltern als Richter	38
39.	2.32. Die Eltern als Helfer	39
40.	2.33. Die Eltern als Begleiter	40
41.	2.34. Die Eltern als Zeugen	41
42.	2.35. Die Eltern als Richter	42
43.	2.36. Die Eltern als Helfer	43
44.	2.37. Die Eltern als Begleiter	44
45.	2.38. Die Eltern als Zeugen	45
46.	2.39. Die Eltern als Richter	46
47.	2.40. Die Eltern als Helfer	47
48.	2.41. Die Eltern als Begleiter	48
49.	2.42. Die Eltern als Zeugen	49
50.	2.43. Die Eltern als Richter	50
51.	2.44. Die Eltern als Helfer	51
52.	2.45. Die Eltern als Begleiter	52
53.	2.46. Die Eltern als Zeugen	53
54.	2.47. Die Eltern als Richter	54
55.	2.48. Die Eltern als Helfer	55
56.	2.49. Die Eltern als Begleiter	56
57.	2.50. Die Eltern als Zeugen	57
58.	2.51. Die Eltern als Richter	58
59.	2.52. Die Eltern als Helfer	59
60.	2.53. Die Eltern als Begleiter	60
61.	2.54. Die Eltern als Zeugen	61
62.	2.55. Die Eltern als Richter	62
63.	2.56. Die Eltern als Helfer	63
64.	2.57. Die Eltern als Begleiter	64
65.	2.58. Die Eltern als Zeugen	65
66.	2.59. Die Eltern als Richter	66
67.	2.60. Die Eltern als Helfer	67
68.	2.61. Die Eltern als Begleiter	68
69.	2.62. Die Eltern als Zeugen	69
70.	2.63. Die Eltern als Richter	70
71.	2.64. Die Eltern als Helfer	71
72.	2.65. Die Eltern als Begleiter	72
73.	2.66. Die Eltern als Zeugen	73
74.	2.67. Die Eltern als Richter	74
75.	2.68. Die Eltern als Helfer	75
76.	2.69. Die Eltern als Begleiter	76
77.	2.70. Die Eltern als Zeugen	77
78.	2.71. Die Eltern als Richter	78
79.	2.72. Die Eltern als Helfer	79
80.	2.73. Die Eltern als Begleiter	80
81.	2.74. Die Eltern als Zeugen	81
82.	2.75. Die Eltern als Richter	82
83.	2.76. Die Eltern als Helfer	83
84.	2.77. Die Eltern als Begleiter	84
85.	2.78. Die Eltern als Zeugen	85
86.	2.79. Die Eltern als Richter	86
87.	2.80. Die Eltern als Helfer	87
88.	2.81. Die Eltern als Begleiter	88
89.	2.82. Die Eltern als Zeugen	89
90.	2.83. Die Eltern als Richter	90
91.	2.84. Die Eltern als Helfer	91
92.	2.85. Die Eltern als Begleiter	92
93.	2.86. Die Eltern als Zeugen	93
94.	2.87. Die Eltern als Richter	94
95.	2.88. Die Eltern als Helfer	95
96.	2.89. Die Eltern als Begleiter	96
97.	2.90. Die Eltern als Zeugen	97
98.	2.91. Die Eltern als Richter	98
99.	2.92. Die Eltern als Helfer	99
100.	2.93. Die Eltern als Begleiter	100

Meinen Eltern in Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

Seite

1.	Einleitung und Fragestellung	1
2.	Methodik	7
2.1.	Patienten	7
2.2.	Blutprobengewinnung	7
2.3.	Plasmagewinnung und -lagerung	7
2.4.	Weiterverarbeitung des Plasmas	7
2.4.1.	Präparative Ultrazentrifugation	8
2.4.2.	Bestimmung des Gesamtcholesterins	13
2.4.3.	Bestimmung der Triglyceride	18
2.4.4.	Bestimmung der Phosphatide	22
2.4.5.	Lipoproteinelektrophorese	27
3.	Statistik	30
4.	Ergebnisse	32
4.1.	Gesamtcholesterin	32
4.2.	Triglyceride	33
4.3.	Phosphatide	33
4.4.	Lipoproteinelektrophorese	38
5.	Diskussion	45
6.	Zusammenfassung	49
7.	Literatur	50



Digitized by the Internet Archive
in 2026

1. Einleitung und Fragestellung

Fette und Lipide als Durchgangsstationen des Fetttransportes, sind im menschlichen Blutplasma unter physiologischen Bedingungen in einer Menge von 5 - 8 g/l enthalten. Diese Verbindungen werden zum Teil mit der Nahrung zugeführt, zum Teil entstehen sie in endogener Synthese.

Die Lipide stellen keine einheitliche Stoffklasse dar. Sie werden gemeinsam verbunden durch ihre Unlöslichkeit in Wasser und getrennt durch ihre Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln.

In diesem heterogenen Lipidgemisch können folgende Lipidfraktionen unterschieden werden:

- a) freies Cholesterin und Ester-Cholesterin
- b) Glyceride (Tri-, Di- und Monoglyceride)
- c) Phosphatide (Lecithin, Lysolecithin, Kephalin, Sphingomyelin)
- d) unveresterte Fettsäuren.

In geringer Anzahl kommen auch Zerebroside und Karotinoide vor.

Da die Serumlipide mit Ausnahme der Salze der freien Fettsäuren zuwenig polar sind, können sie - wie bereits oben erwähnt - nicht als gelöste Substanzen im Serum zirkulieren. Um aber im Plasma transportiert werden zu können, bilden sie mit spezifischen Plasmaproteinen differenzierte, makromolekulare, kolloidal lösliche Komplexe, die als Plasmalipoproteine bezeichnet werden. Das konstante Protein-Lipid-Verhältnis der Plasmalipoproteine bestimmt ihre chemischen und physikochemischen Eigenschaften, wie Größe, Dichte und elektrophoretische Mobilität.

Da die Lipide gegenüber den Proteinen eine wesentlich geringere Dichte besitzen, so sind auch die Plasmalipoproteine von niedrigerer Dichte als die Plasmaproteine.

Die Tatsache, daß sich die Dichte der Plasmalipoproteine über den Bereich von 0,92 g/ml bis maximal 1,21 g/ml erstreckt, macht man sich zunutze bei der Darstellung der Lipoproteine aus dem Plasma durch Flotation im Schwerfeld einer präparativen Ultrazentrifuge. Mit ihrer Hilfe lassen sich die Lipoproteine nach verschiedenen Dichteklassen unterscheiden

(Abb. 1_A, Abb. 3):

1. den VLDL = very low density lipoproteins, prä- β -Lipoproteine
mit der Dichte $d = 0,92 - 1,006$ g/ml
2. den LDL = low density lipoproteins, β -Lipoproteine
mit der Dichte $d = 1,006 - 1,063$ g/ml und
3. den HDL = high density lipoproteins, α -Lipoproteine
mit der Dichte $d = 1,063 - 1,21$ g/ml

Die größten Plasmalipoproteine, als Chylomikronen bezeichnet, besitzen eine noch geringere Dichte als die VLDL und bestehen größtenteils aus Triglyceriden. Mit steigender Dichte nimmt der Proteingehalt von den Chylomikronen über die prä- β -, β - und α -Lipoproteine zu, während der Triglyceridgehalt abnimmt. Die β -Lipoproteine sind die cholesterinreichste, die α -Lipoproteine sind die phosphatidreichste Fraktion (Abb. 1_B).

Sie alle setzen sich in unterschiedlichen, normalerweise jedoch konstanten Konzentrationsverhältnissen aus Proteinen, Triglyceriden, Cholesterin und Phosphatiden zusammen.

Die Lipoproteine können auch elektrophoretisch (FREDRICKSON et al.) eingeteilt werden. Dabei erhält man die Chylomikronen mit einem Molekulargewicht von $10^8 - 10^9$, die prä- β -Lipoproteine (Molekulargewicht $5 \times 10^6 - 5 \times 10^7$), die β -Lipoproteine (Molekulargewicht 2×10^6) und die α -Lipoproteine (Molekulargewicht 165.000 - 400.000), die den mittels der Ultrazentrifuge fraktionierten Dichteklassen (Abb. 1_C) entsprechen.

Sowohl die Dichteklassen der Plasmalipoproteine als auch ihre elektrophoretisch trennbaren Fraktionen stellen heterogene Gruppen in bezug auf ihre Proteinanteile, der Apolipoproteine, dar (Abb. 1_D).

Nach ihrer Aminosäurezusammensetzung, ihren terminalen Aminosäuren, ihrem Molekulargewicht und ihrer antigenen Determinante unterscheiden sich die Apolipoproteine untereinander. Sie werden bezeichnet als:

- a. Apolipoprotein (APO) A mit Untergruppen APO A I und
APO A II,
- b. Apolipoprotein (APO) B und
- c. Apolipoprotein (APO) C mit Untergruppen APO C I
APO C II und
APO C III.

Hinsichtlich der Struktur der Protein-Lipid-Zusammensetzung und des Stoffwechsels der Lipoproteine, kommt den Apolipoproteinen eine zentrale Bedeutung zu. Es ist wahrscheinlich, daß die verschiedenen Apolipoproteine eine unterschiedliche Kapazität besitzen, Fettsäuren und Phospholipide zu binden (34). Die verschiedenen Lipoproteine spielen eine zentrale Rolle bei der Differenzierung und der Suche nach den pathophysiologischen Ursachen der Dislipidämien. Diese Störungen in Menge und Zusammensetzung im Blutplasma treten heute immer häufiger auf. Als Ursachen kommen Störungen der Synthese, hormonelle Fehlsteuerungen und mangelnde Klärfähigkeit des Blutes in Frage (26). Neben der seltener auftretenden Hypolipidämie (z.B. als Folge von Hyperthyreose oder Kachexie), treten die verschiedenen Formen der Hyperlipidämie, durch die heutige Zivilisation bedingt, immer häufiger auf. Bei der Diagnostizierung der Hyperlipidämien unterscheidet man primäre, essentielle Hyperlipoproteinämien, die früher je nach

vorherrschender Lipidfraktion als Hypercholesterinämie, Hyperlipämie oder als Misch-Hyperlipidämie bezeichnet wurden, wobei AHRENS et al. (1) auf das Vorkommen nicht nur fett-, sondern auch kohlehydratinduzierter Hyperlipidämien hingewiesen haben, im Gegensatz zu sekundär, symptomatischer Hyperlipoproteinämien. Symptomatische Hyperlipoproteinämien treten bei bestimmten internen Erkrankungen wie Diabetes mellitus, biliärer bzw. cholangiolitischer Zirrhose, Pankreatitis, Gicht, Morbus Cushing, Hypothyreose, nephrotischem Syndrom, Plasmocytom und Alkoholabusus sowie Zufuhr von Gestagenen auf (11, 16, 22).

FREDRICKSON et al. (12) gelang mit einer verbesserten Lipoprotein-Elektrophorese eine differenziertere Einteilung der Hyperlipoproteinämien in 5 verschiedene Typen.

Nach dem elektrophoretischen Muster bzw. nach Dichteklassen werden heute 6 Typen von Hyperlipoproteinämien unterschieden:

- Typ I = Hyperchylomikronämie
- Typ IIa = Hyper- β -Lipoproteinämie
- Typ IIb = Hyper- β - und Hyper-prä- β -Lipoproteinämie
- Typ III = Hyperlipoproteinämie mit breiter β -Bande
- Typ IV = Hyper-prä- β -Lipoproteinämie
- Typ V = Hyper-prä- β -Lipoproteinämie und Hyperchylomikronämie.

(Der Typ III kann nur durch die Ultrazentrifugation endgültig differenziert werden.)

Es sei daran erinnert, daß die Vermehrung der Blutfette heute zu den Risikofaktoren erster Ordnung gehören. Eine große Anzahl von Veröffentlichungen weisen auf den Zusammenhang zwischen hohen Fettfraktionswerten im Blutserum und Arteriosklerose bzw. Infarktgefährdung hin (11, 28). Die Tatsache, daß Hyperlipoproteinämien mit zahlreichen Erkrankungen einhergehen oder als deren Vorläufer auftreten können, zwingt uns aus prognostischen

und therapeutischen Gründen zu genauen Analysen der Lipidfraktion im Blutplasma, um eine detaillierte Differenzierung von Hyperlipoproteinämien vornehmen zu können.

Da aber nicht jeder Arzt und jedes Labor über die entsprechenden technischen Einrichtungen zur genauen Befunderhebung verfügen, wird es immer notwendiger Serum zur Lipoprotein- und Lipidbestimmung in entsprechend ausgerüstete Großlabors zu verschicken. Wegen der Vielzahl und der zeitlichen Aufwendigkeit der einzelnen Untersuchungen sind diese Laboratorien gezwungen, trotz der Vereinfachung und Verbesserung, welche die Blutfettbestimmungen in den letzten Jahren erfahren haben, die Proben zu sammeln, um sie dann gemeinsam auswerten zu können.

Dabei erhebt sich die Frage, ob und wie die Blutlipide in den einzelnen Lipoproteinfraktionen auf die nach Temperatur und Zeit verschiedenen Bedingungen während der Verschickung bzw. Lagerung reagieren.

Da über diese Reaktionen der Lipoproteine relativ wenige Untersuchungen vorliegen, bestand das Ziel der vorliegenden Arbeit darin, die Stabilität der Blutlipide sowohl im Gesamtplasma als auch in den mit der präparativen Ultrazentrifuge aufgetrennten einzelnen Dichteklassen des Plasmas, den VLDL, LDL und HDL, unter verschiedenen Aufbewahrungszeiten bei Lagertemperaturen unter dem Gefrierpunkt zu untersuchen.

Zur Frage der Haltbarkeit der Blutlipide im Gesamtplasma und in den einzelnen Lipoproteinfraktionen im Plasma bei Lagerung bei Raumtemperatur oder im Kühlschrank verweisen wir auf die Arbeit von BEHRENS (4).

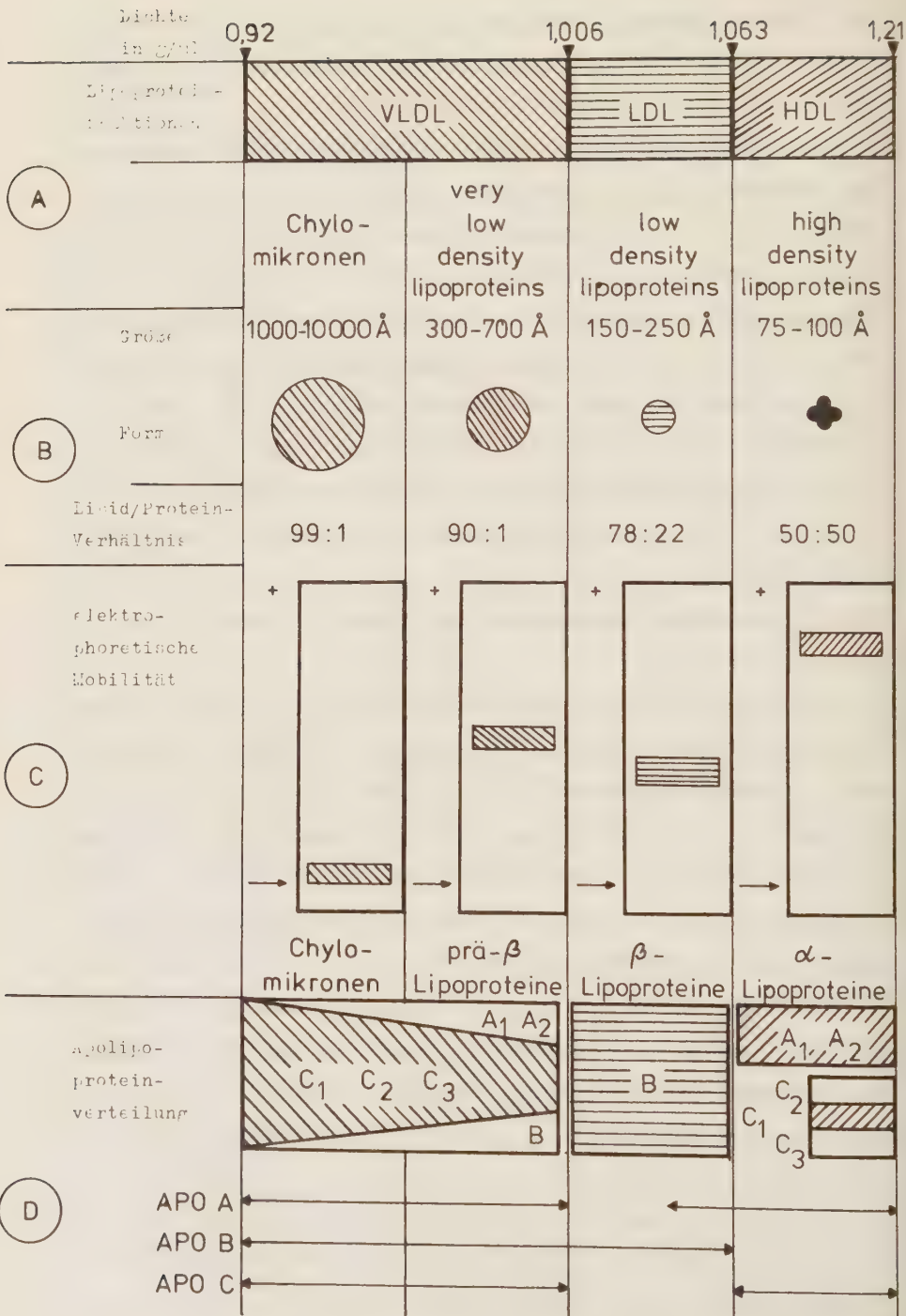


Abb. 1 A - D

2. Methodik

2.1. Patienten

Zur Blutentnahme wurden 8 Patienten mittleren Alters (5 Männer, 3 Frauen) einbestellt, von denen 4 eine Hyperlipidämie Typ II, die anderen 4 eine Hyperlipidämie Typ IV (FREDRICKSON) aufwiesen und die sich in stationärer oder ambulanter Behandlung befanden.

2.2. Blutprobengewinnung

Die Probanden waren angehalten worden, vom Abend vorher bis zur morgentlichen Blutentnahme nüchtern zu bleiben. Die Entnahme des Blutes erfolgte aus der leicht gestauten Armvene. Es wurden pro Patient etwa 120 ml Blut entnommen und in nicht heparinisierten Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Das Blut wurde unverzüglich bei 4.000 U/min über 15 Minuten zentrifugiert. Die Gewinnung der Blutproben erfolgte morgens zwischen 8.00 und 9.00 Uhr.

2.3. Plasmagewinnung und -lagerung

Nach der Zentrifugation der Blutproben wurden pro Patient 40 ml Plasma vom Blutkuchen getrennt und in Portionen zu je 10 ml auf 4 verschiedene Reagenzgläser verteilt.

Für jeden einzelnen Patienten wurden

- a) 10 ml Plasma sofort untersucht;
- b) 10 ml Plasma bei -20°C eingefroren und danach wieder aufgetaut;

je 10 ml Plasma gelagert

- c) 28 Tage bei -20°C
- d) 28 Tage bei -60°C .

Anschließend wurden die Plasmaproben weiterverarbeitet.

2.4. Weiterverarbeitung des Plasmas

Die genannten Plasmamengen zu je 10 ml, die unter den einzelnen Bedingungen gelagert worden waren, wurden nach Ablauf der jeweiligen Lagerungszeit in zwei verschiedene Portionen aufgeteilt:

- a) in 3 ml Plasma zur Sofortuntersuchung auf seinen Gehalt an
- Gesamtcholesterin
 - Triglyceriden
 - Phosphatiden
 - sowie zur Lipoproteinelektrophorese,
- b) in 7 ml Plasma zur Fraktionierung in die VLDL, LDL und HDL in der präparativen Ultrazentrifuge. Die einzelnen Fraktionen wurden ebenfalls auf ihren Gehalt an
- Gesamtcholesterin
 - Triglyceriden
 - Phosphatiden untersucht.
- Zur Kontrolle der exakten Trennung der einzelnen Fraktionen voneinander und zur Überprüfung, ob diese Lipoproteingruppen durch die Lagerungsbedingungen ihre elektrophoretische Mobilität veränderten, wurde mit dem jeweils abgetrennten Zentrifugat ein elektrophoretischer Lauf durchgeführt.

2.4.1. Präparative Ultrazentrifugation

Zur Trennung des Plasmas in die einzelnen Lipoproteinfraktionen benutzten wir die Methode nach HAVEL, EDER und BRAGDON (15) unter Berücksichtigung eigener Erfahrungen.

Das Plasmalipoproteinspektrum erstreckt sich über den Dichtebereich von 0,92 - 1,21 g/ml. Bei einer Untersuchung in der analytischen Ultrazentrifuge zeigt sich, daß in diesem Dichteintervall keine kontinuierliche Verteilung der Lipoproteine vorliegt, sondern immer wiederkehrende Konzentrationsmaxima und -minima auftreten. Letztere Konzentrationsminima gelten

als Grenzdichten zur Fraktionierung der Plasmalipoproteine nach Dichteklassen mit Hilfe der präparativen Ultrazentrifuge. Mit ihr lassen sich die Plasmalipoproteine in prinzipiell 3 Klassen (Abb. 1_A) fraktionieren, indem das Plasma wiederholt zentrifugiert und dabei die Lösungsmitteldichte durch die Zugabe einer Stammsalzlösung konstanter Dichte fortlaufend erhöht wird (Abb. 3).

Zur Erhöhung der Lösungsmitteldichte wurde eine konzentrierte Salzlösung mit dem spezifischen Gewicht von 1,346 g/ml als Stammlösung verwandt. Lösungen geringerer Dichte können durch Zusetzen dieser Stammlösung in ihrer Dichte nach Bedarf angehoben werden.

Die gewünschte Dichte d_G der Mischung berechnet sich nach der Gleichung:

$$A \cdot d_{VL} + B \cdot 1,346 = (A + B) \cdot d_G$$

wobei A das Volumen der vorliegenden Lösung,

B das Volumen der zuzugebenden konzentrierten
Stammlösung

und d_{VL} die Dichte der vorliegenden Lösung bedeuten.

Daraus folgt für die hinzuzufügende Menge B der Stammlösung:

$$B = A \cdot \frac{d_G - d_{VL}}{1,346 - d_G} \quad (F_1)$$

Aus der erwähnten Stammlösung wurden durch Zugabe einer genau berechneten Menge aqua bidest. (F_1) der Dichte 1,0 g/ml zwei weitere Salzlösungen der konstanten Dichten 1,063 g/ml und 1,21 g/ml hergestellt, um bei der Durchführung der Ultrazentrifugation auftretende zu geringe Serummengen der entsprechenden Dichte mit isotonischer Salzlösung auffüllen zu können.

Chemikalien:

NaCl p.a. reinst

KBr p.a. reinst

Stammlösung:

In 1 Liter aqua bidest. wurden 153,0 g NaCl und 354,0 g KBr gelöst. Diese Lösung hat die Dichte $d = 1,346 \text{ g/ml}$. Um zu verhindern, daß sich die Dichte der Lösung durch Verdunstung ändert, mußte sie gut verschlossen aufbewahrt werden.

Apparatur:

Ultrazentrifuge BECKMANN, Modell L 3 - 50

Rotor BECKMANN, Typ 40 - 3

Zentrifugenröhrchen BECKMANN, Nitrozellulose mit 7,5 ml Rauminhalt vor Aufsetzen des Verschlusses

Röhrchenschneidevorrichtung RANDOLPH und RYAN, Nr. 210

Verschlußkappen BECKMANN

Durchführung:

Im Gegensatz zu JAHNKE und SCHOLTAN (18), die nach präparativer Ultrazentrifugation die lipoproteinhaltige flotierte Oberflächenschicht mit einer Kapillarpipette absaugten, wurde bei der vorliegenden Arbeit die Spitzenfraktion mit den gewünschten Lipoproteinen durch Zerschneiden des Zentrifugenröhrchens mit der erwähnten Röhrchenschneidevorrichtung in einer klaren, farblosen, eiweißfreien, lipoproteinarmen Salzhase von der Bodenfraktion getrennt, in der sich die sedimentierten Lipoproteine und Serumproteine befanden (Abb. 2). Zur Gewinnung der einzelnen Lipoproteinfraktionen (Abb. 3) wurde ein Zentrifugenröhrchen mit 6,8 ml des jeweils zu untersuchenden Serums blasenfrei gefüllt. Bei Verwendung der zuvor erwähnten Nitrozelluloseröhrchen haben eigene Versuche ergeben,

daß die Menge von 6,8 ml Serum aus zwei Gründen die günstigste Füllmenge darstellt:

Ad eins wurde eine genügend große Serummenge benötigt, die sicherstellte, daß nach Auslauf der Zentrifuge die zum Zerschneiden des Röhrchens notwendige klare lipoproteinarme Lösungszone zwischen flotierten und sedimentierten Teilchen ausreichende Breite aufwies. Damit sollte verhindert werden, daß sich beim Abtrennen der Spitzenfraktion die getrennten Stoffe durch die Erschütterung wieder vermischten. Ad zwei war mit 6,8 ml die Füllhöhe des Röhrchens, welches maximal 7,5 ml faßt, genau so bemessen, daß beim Aufsetzen und anschließenden Verschrauben des Verschlusses kein Serum herausgedrückt wurde, damit verlorenging und das Ergebnis verfälschte. Mit der Füllmenge von genau 6,8 ml Serum war das Röhrchen so vollständig gefüllt, daß nur eine unvermeidlich kleine Luftblase zwischen Verschlußkappe und Serumoberfläche verblieb (Abb. 2).

Vor Beginn eines jeden Laufes wurde die Ultrazentrifuge gemeinsam mit dem Rotor auf eine Temperatur von +12 °C vortemperiert. Diese Temperatur wurde über die Dauer eines jeden Laufes (22 Std. bei 40.000 U/min) konstant eingehalten; 40.000 U/min entsprechen einem RCF-Wert ⁺) von 114.000 g.

⁺) $RCF = \text{Relative Centrifugal Force} = \frac{\text{Zentrifugalkraft}}{\text{Gravitationskraft}} = \frac{\omega \cdot r}{g}$

$= 1,119 \cdot 10^{-3} \cdot r \text{ (rpm)}^2$; (r = Radius des Rotors in
Meter
(rpm = Umdrehung pro Minute)

1. Fraktionierungsverfahren

Zu Beginn der Ultrazentrifugation wurden 6,8 ml des jeweils zu fraktionierenden Serums in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert. Das Röhrchen wurde fest verschlossen und in den präparativen Rotor eingeführt, der 18 solcher Proben aufnehmen kann. Nachdem der Rotor in die UZ eingesetzt worden war, rotierte er genau 22 Stunden mit einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 40.000 U/min. Da das Serum eine Dichte von 1,006 g/ml besitzt, flotierten innerhalb dieses Zeitraumes alle Lipoproteine der Dichte $d < 1,006$ g/ml, d.h. der Gruppe der VLDL (Abb. 1), quantitativ zur Oberfläche, während die Lipoproteine der Dichte $d > 1,006$ g/ml sedimentierten und sich in der Bodenfraktion anreicherten. Nach Auslaufen der UZ wurden die Proben dem Rotor entnommen und mit der erwähnten Schneidevorrichtung in einer konstanten Entfernung vom Boden der Verschlußkappe in der klaren, farblosen Lösungsschicht getrennt (Abb. 2). Dieser konstante Abstand wurde in Vorversuchen am Schneidegerät so eingestellt, daß sich die Spitzenfraktion mit den gewünschten Lipoproteinen nach Durchtrennen des Röhrchens in einer Lösungsmenge von 2,5 ml befanden. Der abgetrennte obere Teil des Röhrchens mit der Verschlußkappe wurde vorsichtig aus der Dichtung des Schneidegerätes gezogen; die 2,5 ml Lösung mit den VLDL wurden vollständig in ein Reagenzglas umpipettiert und zur weiteren Untersuchung verwendet. Da beim Zerschneiden des Röhrchens trotz der Dichtungen des Schneidegerätes nicht vermieden werden konnte, daß 0,4 ml der klaren Lösungsphase verloren gingen, befand sich der sedimentierte Bodensatz mit den schwereren Lipoproteinen und Serumproteinen in einer Lösung des Volumens 3,9 ml. Nach Aufrühren der an der Röhrchenwand angereicherten Lipoproteine wurde die Dichte der Lösung von 1,006 g/ml auf 1,063 g/ml mit Hilfe der bereits erwähnten Stammlösung nach dem zuvor

beschriebenen Verfahren (F_1) erhöht. Diese Lösung wurde zur Gewinnung der nächsthöheren Fraktion erneut in ein Zentrifugenröhrchen eingefüllt. Da zur vollständigen Füllung des Röhrchens keine 6,8 ml vorlagen, wurde die fehlende Flüssigkeitsmenge durch Zugabe einer isotonen Salzlösung ergänzt.

2. Fraktionierungsverfahren

Präparative Ultrazentrifugation zur Gewinnung der LDL bei einer Lösungsmitteldichte von 1,063 g/ml. Das weitere Verfahren wurde analog zur ersten Fraktionierung vorgenommen.

3. Fraktionierungsverfahren

Präparative Ultrazentrifugation zur Gewinnung der HDL bei einer Lösungsmitteldichte von 1,21 g/ml. Die weitere Behandlung erfolgte analog zur ersten und zweiten Fraktionierung.

Bei den auf die Ultrazentrifugation folgenden Untersuchungen der VLDL, LDL und HDL war folgendes zu beachten:

Da in das Volumen von 2,5 ml die jeweils gewünschten Lipoproteine floriert waren, die ursprünglich in 6,8 ml vorlagen, wurden so die Lipoproteine auf das

$$\frac{6,8}{2,5} = 2,72\text{-fache der Ausgangskonzentration angereichert.}$$

Daher mußten die Resultate der Cholesterin-, Triglycerid- und Phosphatidbestimmung mit diesem Faktor korrigiert werden.

2.4.2. Bestimmung des Gesamtcholesterins

Zur Bestimmung des Gesamtcholesterins wurde die Methode von WATSON (31), in der Modifikation nach RICHTERLICH und LAUBER (27) angewandt.

Prinzip:

Die Methode beruht auf der Farbreaktion nach LIEBERMANN (23) und BURCHARD (6). Zur Bestimmung des Gesamtcholesterins

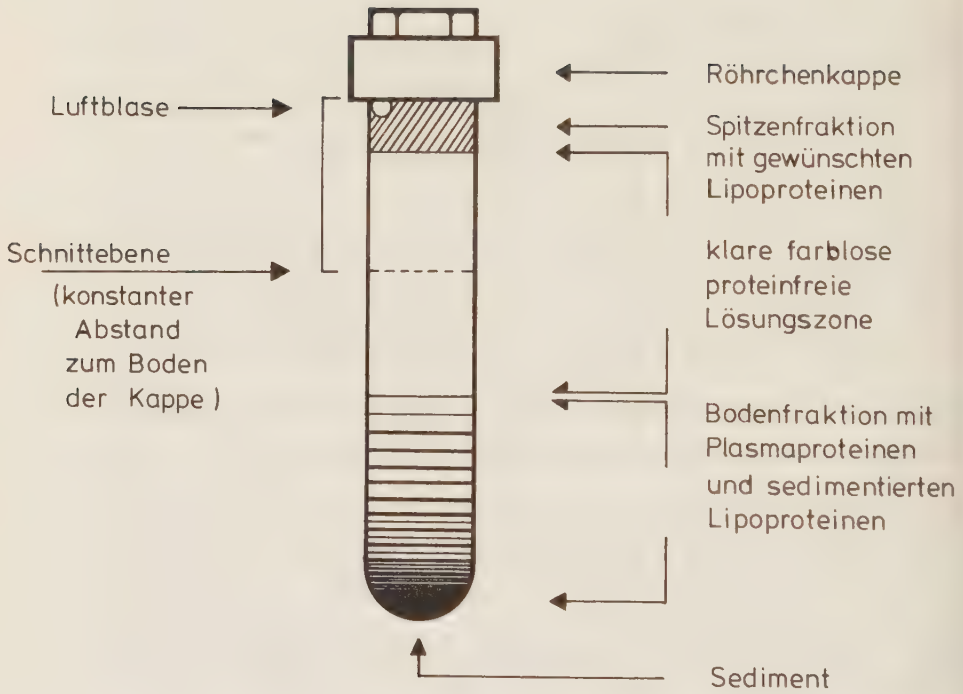


Abb. 2 : Verteilung der Plasmakomponenten in einem Ultrazentrifugenröhrchen nach einem präparativen Ultrazentrifugelauf.

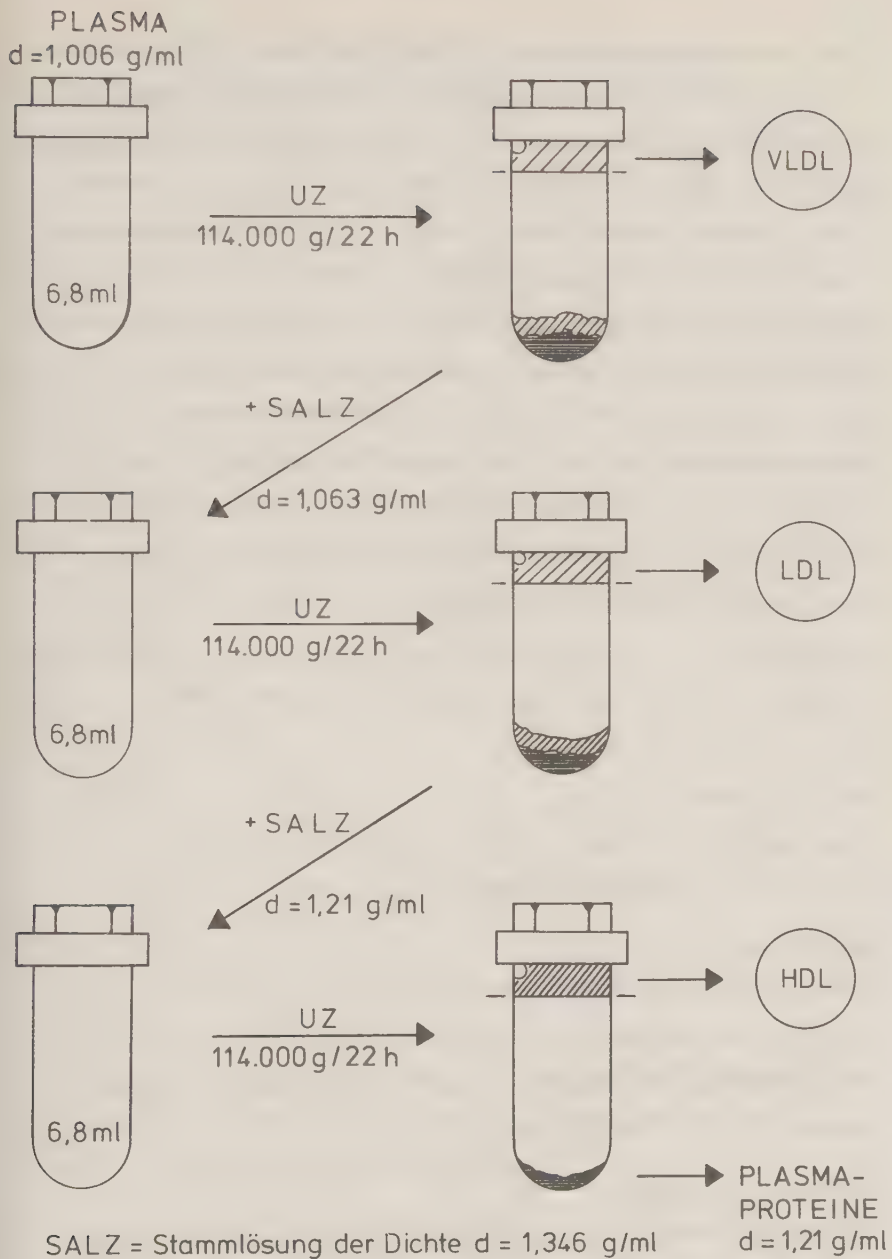


Abb.3 : Isolierung der Plasmalipoproteine-Fraktion mit Hilfe der präparativen Ultrazentrifuge (UZ).

wurde eine Testkombination von Boehringer-Mannheim verwendet. Bei der Behandlung von Sterinen mit Essigsäureanhydrid und konzentrierter Schwefelsäure entstehen in wasserfreiem Milieu polymere ungesättigte Kohlenwasserstoffe mit intensiv blau-grüner Färbung, deren Intensität der Cholesterinkonzentration proportional ist und photometrisch gemessen werden kann. Die Wahl der Wellenlänge ist problematisch, weil das Maximum der LIEBERMANN-BURCHARD-Reaktion im Absorptionsbereich bei über 600 nm liegt, die Ablesung aber unter 580 nm erfolgen muß, da bei langwelligem Licht die Farben nicht stabil sind. Statt einer vollständigen Eiweißfällung wird durch den Zusatz von methylierten Benzolsulfonsäuren das Eiweiß als Dispersion bzw. Präzipitation in Lösung gehalten.

Chemikalien:

Eisessig p.a.

Cholesterin rein

Essigsäureanhydrid p.a.

konz. Schwefelsäure p.a.

2,5-Dimethyl-Benzolsulfonsäure p.a.

Reagentien:

5,5 mg Dimethyl-Benzolsulfonsäure wurden in 100 ml Eisessig gelöst, dazu wurden 300 ml Essigsäureanhydrid und 100 ml Eisessig gegeben. Das Reagenz ist gut verschlossen bei Raumtemperatur ca. ein Jahr haltbar.

Cholesterinstandard:

200 mg Cholesterin wurden in 100 ml Eisessig gelöst. Um das Auskristallisieren von Cholesterin zu vermeiden, wurde die Lösung bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

Durchführung der Gesamtcholesterinbestimmung:

Zur Erhöhung der Genauigkeit wurden die Analysen stets als Doppelbestimmung durchgeführt.

In trockene Reagenzröhrchen wurden 0,1 ml Serum bzw. 0,1 ml Cholesterinstandard bzw. aqua bidest. für den Leerwert pipettiert. Daraufhin wurden in jedes Reagenzglas 2,5 ml Cholesterinreagenz gegeben und die Röhrchen nach Schütteln für 5 Minuten in ein Wasserbad von 20 °C gestellt. Danach wurden zu jedem Ansatz 1 ml konzentrierte Schwefelsäure hinzugefügt und im Wasserbad weitere 10 min intensiv geschwenkt. Das Reaktionsgemisch wurde in Küvetten von 1 cm Schichtdicke gefüllt und bei 578 nm wurden die Extinktionen des Standards und der einzelnen Sera im EPPENDORF-Photometer gegen den Leerwert gemessen.

Berechnung der Gesamtcholesterinkonzentration:

Nach dem LAMBERT-BEER'schen Gesetz gilt:

$$1. \quad \frac{c_P}{c_{St}} = \frac{E_P}{E_{St}}$$

wobei C die Konzentration, E die Extinktion und die Indices P bzw. St Probe bzw. Standard bedeuten.

Daraus folgt:

$$c_P = \frac{E_P}{E_{St}} \cdot c_{St}$$

c_{St} ist mit 200 mg/100 ml bekannt, so daß sich mit den gemessenen Extinktionen E_P und E_{St} für die zu bestimmende Konzentration die Bestimmungsgleichung ergibt:

$$c_P = 200 \cdot \frac{E_P}{E_{St}} \cdot \frac{\text{mg}}{100 \text{ ml}}$$

Kritik:

Das Umgehen der sonst üblichen Extraktion und der Enteiweißung zur Bestimmung des Gesamtcholesterins vermindert die Zahl der Arbeitsschritte, somit auch die Fehlerquellen. Durch Verarbeiten von hämolytischen oder ikterischen Seren werden die Ergebnisse stark verfälscht.

Fehlerbreite:

Bei 10 Parallelbestimmungen ergab sich ein Mittelwert von $268 \text{ mg}/100 \text{ ml} \pm 9,25 \text{ mg}/100 \text{ ml}$, was einer Standardabweichung von 3,45 % entsprach.

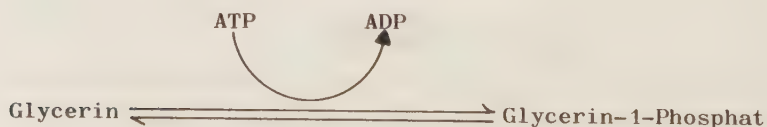
2.4.3. Bestimmung der Triglyceride

Die Analyse der Triglyceride erfolgte nach der von EGGSTEIN und KREUTZ (7) und SCHMIDT et al. (30) entwickelten enzymatischen Methode. Zur Bestimmung wurde eine Testkombination der Firma Boehringer-Mannheim verwendet.

Prinzip:

Bei dieser enzymatischen Bestimmung wird nach erfolgter vollständiger Hydrolyse das gewonnene Glycerin mit Adenosintriphosphat (ATP) und Glycerokinase (GK) umgesetzt und mit den Hilfsenzymen Pyruvatkinase (PK) und Lactatdehydrogenase (LDH) der NADH-Verbrauch im optischen Test gemessen.

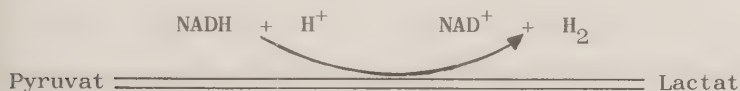
Dabei wird das nach der Verseifung der Fette entstandene Glycerin in der durch das Enzym Glycerokinase katalysierten Reaktion mit Hilfe von ATP zu Glycerin-1-Phosphat phosphoryliert:



Durch das Enzym Pyruvatkinase (PK) wird das entstandene ADP durch Phosphoenolpyruvat (PEP) unter Bildung von Pyruvat wieder in ATP überführt:



Pyruvat wird nun durch NADH mittels Lactatdehydrogenase (LDH) zu Lactat reduziert, wobei NADH zu NAD^+ oxydiert wird:



Die während der Umwandlung von Glycerin in Glycerin-1-Phosphat verbrauchte Menge an NADH ist der vorhandenen Glycerinmenge äquivalent. Die Abnahme der Extinktion während der Oxydation von NADH zu NAD^+ ist der im Reaktionsansatz vorhandenen Glycerinmenge direkt proportional und ist bei einer Wellenlänge von 366 nm meßbar.

Das gesamte Glycerin abzüglich des vor der Verseifung vorhandenen freien Glycerins entspricht dem veresterten Glycerin in den Neutralfetten. Von den errechneten Neutralfettwerten wurden jeweils 10 mg als Korrektur für das freie Glycerin abgezogen.

Chemikalien:

Triäthanolaminpuffer

MgSO_4 reinst

Phosphoenolpyruvat

NADH

ATP

Lactatdehydrogenase

Pyruvatkinase

Glycerokinase

MgSO₄-Lösung (etwa 0,15 M)

äthanolisches KOH (etwa 0,5 M)

Reagentien:

Lösung I : Puffer: 4 mM Triäthanolaminpuffer und 0,16 mM MgSO₄ werden in 40 ml aqua bidest. gelöst, woraus ein pH-Wert von 7,6 resultiert.

Diese Pufferlösung ist etwa ein Jahr bei Zimmertemperatur haltbar.

Lösung II : 3,6 μ M NADH, 19,8 μ M ATP und 6,6 μ M PEP werden in 0,6 ml aqua bidest. gelöst.

Die Lösung ist bei +4 °C über zwei Wochen haltbar.

Lösung III : 2 mg LDH und 1 mg PK sind in 1 ml der Suspension enthalten. Die Suspension ist bei +4 °C etwa ein Jahr lang haltbar.

Lösung IV : 2 mg GK sind in 1 ml der Suspension enthalten. Bei +4 °C beträgt die Haltbarkeit ebenfalls etwa ein Jahr.

Durchführung der Triglyceridbestimmung:

Zur Verringerung der Fehlerbreite bei der Bestimmung der Triglyceride wurden auch hier Doppelbestimmungen durchgeführt. Von jeder Plasmaprobe wurden 0,2 ml in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert; durch Zugabe von 0,5 ml äthanolischer KOH und 30-minütigem Erhitzen in einem Wasserbad von +70 °C wurde die alkalische Verseifung der Triglyceride durchgeführt. Anschließend mußten die Röhrchen mit dem Ansatz wieder auf Raumtemperatur abkühlen. Zur Enteiweißung des Verseifungsgemisches wurde danach in jeden Ansatz 1,0 ml MgSO₄-Lösung pipettiert und gut durchgemischt. Diese Lösung wurde sodann 8 Minuten bei 5000 U/min zentrifugiert. Der dadurch entstandene

eiweißfreie, klare Überstand wird zur weiteren Bestimmung eingesetzt. In eine Küvette von 1 cm Schichtdicke wurden 0,2 ml des klaren Überstandes, von Lösung I 1,0 ml, von Lösung II 0,05 ml sowie 0,01 ml der Lösung III pipettiert. Mit einem Plastikspatel wurde das Reaktionsgemisch durchgerührt und bei Raumtemperatur 10 Minuten stehen gelassen.

Im Anschluß daran wurde bei einer Wellenlänge von 366 nm die Extinktion E_1 im EPPENDORF-Photometer gegen den Leerwert Luft gemessen.

Dem Gemisch wurde anschließend von Lösung IV 0,01 ml zugegeben, wiederum durchgemischt und nach Ablauf von weiteren 10 Minuten die Extinktion E_2 gegen den Leerwert bestimmt.

Berechnung:

Für die Berechnung von Substratkonzentrationen gilt allgemein die Gleichung:

$$c = \frac{MG}{\epsilon \cdot d \cdot 10} \cdot \frac{V}{v} \cdot F \cdot \Delta E \cdot \frac{mg}{100 \text{ ml}}$$

Der Extinktionskoeffizient ϵ von NADH beträgt bei 366 nm $3,3 \text{ cm}^2/\mu\text{M}$.

Der Gehalt an Neutralfett wird über seinen Glycerinanteil berechnet. Das mittlere Molekulargewicht der Plasmatriglyceride beträgt 885, das des Glycerins 92. Außerdem muß die durch Verseifung eingetretene Verdünnung berücksichtigt werden, was mit Hilfe des Faktors F vorgenommen wird:

$$F = \frac{885 \cdot 1,70}{92,1 \cdot 0,2} = 81,68$$

V ist das Volumen der gesamten in die Küvette eingebrachten Lösungsmengen (1,27 ml), v das Volumen des eingesetzten Überstandes aus der Verseifungsreaktion (0,2 ml).

Für ΔE gilt: $\Delta E = E_1 - E_2$

Der Durchschnittsgehalt des Plasmas an freiem Glycerin ist noch mit 1,0 mg/100 ml zu berücksichtigen, was nach den oben angeführten Molekulargewichten etwa 10 mg/100 ml Neutralfett entspricht.

Daraus ergibt sich für die Berechnung der Konzentration c der Triglyceride im Plasma folgende Bestimmungsgleichung:

$$c = (1432 \cdot \Delta E - 10) \cdot \frac{\text{mg}}{100 \text{ ml}}$$

Fehlerbreite:

Bei 10 durchgeführten Parallelbestimmungen ergab sich ein Mittelwert von 188,2 mg/100 ml $\pm$ 3,48 mg/100 ml. Das entspricht einer Standardabweichung von 1,85 %.

2.4.4. Bestimmung der Phosphatide

Die Bestimmung des Phosphatidgehaltes im Plasma wurde nach der Methode von BARTLETT (3) mit der Veraschung nach ALLEN (2) nach Extraktion der Lipide durch das von FOLCH et al. (10) entwickelte Verfahren durchgeführt.

Prinzip:

Nach Extrahieren der Plasmalipide mit organischen Lösungsmitteln wurde der Lipidphosphor im FOLCH-Extrakt durch Veraschen mit Perchlorsäure und anschließender Molybdänblaureaktion bestimmt. Der Phosphatidgehalt wurde über die Extinktion im ZEISS-Spektralphotometer berechnet.

Chemikalien:

Chloroform DAB 6

Methanol p.a.

NaCl-Lösung ges.

Perchlorsäure p.a. 70 %ig

Ammoniummolybdat p.a.

Natriumsulfit p.a.

1-Amino-2-Naphtol-4-Sulfonsäure p.a.

Natriumpyrosulfit p.a.

Kaliumdihydrogenphosphat p.a.

konz. Schwefelsäure p.a.

Reagentien:

Reduktionsreagenz (Phosphorreagenz) nach FISKE und

SUBBAROW (9):

0,5 g 1-Amino-2-Naphtol-4-Sulfonsäure und
2,0 g wasserfreies Natriumsulfit werden
in 200 ml frisch angesetzter 13,7 %iger
Natriumpyrosulfitlösung unter Umrühren
gelöst. Diese Lösung wird durch einen Pa-
pierfilter filtriert und in einer dunklen
Flasche aufbewahrt (etwa zwei Wochen
haltbar).

Ammoniummolybdatlösung 0,22 %ig (2,2 g ad 1000 ml aqua bidest.)

Anorganischer Phosphorstandard:

Kaliumdihydrogenphosphat wird während
8 - 10 Stunden mit Phosphorpentoxyd bei
+60 °C in einer Trockenpistole getrocknet.
0,3509 g des so getrockneten Kaliumdihydro-
genphosphats werden in einem 1000 ml-Meß-
kolben in aqua bidest. gelöst. Danach wer-
den 10 ml 10 n Schwefelsäure zugesetzt

und mit bidestilliertem Wasser bis zur Eichmarke aufgefüllt. Diese Stammlösung enthält 0,4 g Phosphor in 50 ml. Sie ist unbegrenzt haltbar, muß aber wegen Verdunstungsgefahr sehr gut verschlossen gehalten werden.

Durchführung der Lipidextraktion:

Pro Ansatz wurden 0,5 ml Plasma in einen verschließbaren Meßkolben (25 ml) gegeben. Nun setzt man 16 ml Chloroform zu und füllt mit Methanol auf 25 ml auf. Der verschlossene Kolben wurde kräftig geschüttelt und das Gemisch durch einen Papierfilter in einen ERLENMEYER-Kolben filtriert. Von dem gewonnenen Filtrat wurden 20 ml in einen Schütteltrichter gefüllt und sofort mit 40 ml gesättigter Kochsalzlösung versetzt. Nach ausgiebigem Schütteln wurde die Lösung zum Absetzen der Chloroformphase für 30 Minuten stehengelassen. Durch das Schütteln des Filtrats mit gesättigter NaCl-Lösung wurde eine Abtrennung des anorganischen Phosphors erreicht, der im Methanol-H₂O-NaCl-Gemisch zurückbleibt. Nach 30 Minuten wurde die Chloroformphase durch einen Papierfilter in ein verschließbares Schliffgläschen abgelassen.

Durchführung der Phosphatidbestimmung:

Die Phosphatidanalyse wurde wiederum als Doppelbestimmung durchgeführt.

Von dem gewonnenen Lipidextrakt wurden nun zur weiteren Bestimmung 0,5 ml in ein Reagenzglas gegeben und für die Dauer von 5 Minuten bei 70 °C in einem Wasserbad eingedampft. Danach erfolgte die Veraschung (Überführen des Phosphors in seine höchste Oxidationsstufe: P₂O₅) durch Zugabe von 0,4 ml 70 %iger Perchlorsäure und anschließendem Einbringen in ein Sandbad

von 180 °C für die Dauer von 60 Minuten. Nach Erkalten der Proben wurden 4,6 ml einer 0,22 %igen Ammoniummolybdatlösung und 0,4 ml Reduktions- bzw. Phosphorreagenz zugesetzt, wobei das Ammoniummolybdat mit PO_4^{--} -Ionen Phosphormolybdänsäure $\text{H}_3 (\text{P} (\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4)$ bildet. Das erwähnte Reduktionsreagenz reduziert die Phosphormolybdänsäure zu Mo_3O_8 = Molybdänblau, das photometrisch gemessen werden kann.

Nach intensivem Schütteln wurden die verschlossenen Proben für 7 Minuten in ein schwach siedendes Wasserbad gestellt und danach abgekühlt.

Zur Bestimmung wurden Leerwerte mitgeführt, indem 0,4 ml 70 %ige Perchlorsäure in leere Schliffgläser gegeben und mit den übrigen Proben analog weiterverarbeitet wurde.

Außerdem wurden Standardproben mitgeführt.

Hierzu wurde ein sogenannter Tagesstandard hergestellt:

2,5 ml des Phosphorstandards wurden mit aqua bidest. auf 50 ml aufgefüllt. In zwei Schliffgläser wurden statt 0,5 ml Plasma die gleiche Menge des Tagesstandards pipettiert, die mit eingedampft und in gleicher Weise wie die anderen Analysenproben weiterbehandelt wurde.

Die Messung der Extinktion der Proben und des Standards erfolgte gegen den Leerwert bei 830 nm (U-Rotlicht) in Quarzküvetten von 1 cm Schichtdicke im ZEISS-Spektralphotometer.

Berechnung:

Die Konzentration der Phosphatide wird nach dem LAMBERT-BEER'schen Gesetz berechnet:

$$c = \frac{\text{Extinktion Probe}}{\text{Extinktion Standard}} \cdot 320$$

Aus der Extraktion der Proben ergeben sich gegenüber dem nicht extrahierten Standard zwei Verdünnungsfaktoren von 4 und 32, die berücksichtigt werden müssen. Daraus folgt:

$$\text{Phosphor/ml Plasma} = \frac{E_P}{E_{St}} \cdot 4 \cdot 32$$

$$\frac{\text{Phosphor in mg}}{100 \text{ ml}} = \frac{E_P}{E_{St}} \cdot 4 \cdot 32 \cdot 0,1$$

Da bei der Bestimmung der Lipidphosphor ermittelt wird, muß für die Umrechnung in Phosphatide der Phosphorgehalt mit dem Faktor 25 multipliziert werden:

$$\frac{\text{mg Phosphatide}}{100 \text{ ml}} = \frac{E_P}{E_{St}} \cdot 4 \cdot 32 \cdot 25 \cdot 0,1$$

Für die Konzentration c_{Ph} der Phosphatide im Plasma ergibt sich somit:

$$c_{Ph} = \frac{E_P}{E_{St}} \cdot 320 \quad \frac{\text{mg}}{100 \text{ ml}}$$

Kritik:

Die Methode erfordert einen sehr großen Aufwand an Zeit und Geräten.

Die verwendeten Glasgeräte müssen absolut sauber sein. Durch die hohe Empfindlichkeit der Reaktion ist sie schon gegen geringste Verunreinigungen, beispielsweise Spülmittelreste und ungenügend destilliertes Wasser anfällig, und es treten Fehler in der Bestimmung auf.

Fehlerbreite:

Bei 10 Parallelbestimmungen ergab sich ein Mittelwert von 350 mg/100 ml $\pm$ 9,40 mg/100 ml, was einer Standardabweichung von 2,68 % entsprach.

2.4.5. Lipoproteinelektrophorese

Die Lipoproteinelektrophorese wurde nach der Methode von KAHLKE, RAPP und SCHLIERF (19, 20, 21) auf Agarose-Gel durchgeführt.

Prinzip:

Die Lipoproteine wandern ebenso wie alle anderen Proteine bei schwach alkalischem pH von der Kathode zur Anode.

Mit einem Farbstoff, z.B. Sudanschwarz, der nur Lipide anfärbt, kann man die von den Lipoproteinen transportierten Fette und fettähnlichen Substanzen zur Darstellung bringen und damit indirekt die Lipoproteine.

Apparatur:

Elektrophoresegerät UG 1 ⁺)

Trennkammern aus Kunststoff ⁺)

Querstanze (12 x 2 mm) ⁺)

Lochstanze (2 mm Ø) ⁺)

Schablone zum Ausstanzen der Gräben ⁺)

Wasserstrahlpumpe mit Ansatz

Glasplatten (120 x 90 x 1 mm)

Chemikalien:

Essigsäure p.a.

Glycerin bidest. p.a. (ca. 87 %ig)

1 n NaOH

Aceton p.a.

Äthanol p.a.

⁺) : Fa. DESAGA, Heidelberg

Agarose-Instant-Gel A 08-82 ⁺⁺)
Veronal-Natriumphosphat-Puffer ⁺⁺)
Humanalbumin, trocken, reinst ⁺⁺⁺)
Bromphenolblau
Sudanschwarz

Durchführung der Lipoproteinelektrophorese:

Das mit Veronal-Natriumphosphat vermischte Agarose-Instant-Pulver (Instant-Gel A 08-82) wurde mit 100 ml aqua dest. kurz aufgeköcht (Konzentration der Agarose 0,8 %, des Puffers 0,05 M, pH = 8,2). Zu 100 ml des im Wasserbad auf 55 °C abgekühlten, flüssigen Gels wurden 0,2 g Humanalbumin zugesetzt und solange im 55 °C warmen Wasserbad geschwenkt, bis das Humanalbumin vollständig im Gel gelöst war.

Der Zusatz von Humanalbumin läßt die getrennten Banden etwas breiter erscheinen und vermindert das sonst oft beobachtete " Schwänzen " der Banden.

Die Verbindungsschlitze der Kunststofftrennkammern wurden mit Klebeband verschlossen. Anschließend wurden 48 ml des fertigen Gels blasenfrei so in die genau horizontal gelagerte Trennkammer gefüllt, daß auch die verschlossenen Verbindungsschlitze vollständig ausgefüllt waren. Danach wurde die Glasplatte, die zuvor 15 Minuten in Aceton p.a. vollständig entfettet worden war, vorsichtig in das eingefüllte Gel abgesenkt. Dabei war darauf zu achten, daß sich unterhalb und oberhalb der Glasplatte keine Luftblasen bildeten und die Glasplatte

⁺⁺) : Fa. SERVA LABOR, Heidelberg

⁺⁺⁺) : BEHRINGWERKE AG, Marburg

die Verbindungsschlitze nicht überragte. Die Kammer wurde dann zum Erstarren des Gels eine Stunde auf den Kühlblock des Elektrophoresegerätes gelegt.

Mit Schablone und Querstanze wurden 3 cm vom Rand der Schmal-seite der Platte entfernt im Abstand von 5 mm vier Vertiefungen (12 x 2 mm) ausgehoben. Da die Querstanze das ausgestanzte Gel nicht immer mit aus der Schicht hob, wurde es mit einer Wasserstrahlpumpe vorsichtig abgesaugt. Am Rand der Platte wurde mit einer Rundstanze (2 mm Ø) ein Loch in gleicher Höhe mit den vier Vertiefungen für Bromphenolblau angebracht, durch dessen Position der Verlauf der Trennung verfolgt werden konnte. Daraufhin wurden die zu untersuchenden Plasmaproben vorbereitet. Von klaren Plasmaproben wurden 0,2 ml mit 0,1 ml physiologischer Kochsalzlösung und 0,2 ml des zubereiteten Gels gemischt.

Bei getrübtetem Plasma wurde dagegen 0,1 ml mit 0,3 ml physiologischer Kochsalzlösung und 0,6 ml des Gels vermischt. Die so zubereiteten Proben mußten im Wasserbad auf 55 °C gehalten werden, um zu verhindern, daß das Gel vor dem Einfüllen in die ausgestanzten Gräben erstarrte.

Von diesen Plasmaproben wurden dann jeweils 0,03 ml mit einer EPPENDORF-Pipette in die ausgestanzten Gräben eingefüllt und anschließend mit einigen Tropfen des Gels bedeckt.

Die Trennkammern wurden dann nach Entfernen der Klebestreifen auf den Kühlblock des Elektrophoresegerätes gesetzt. Über die mit Gel ausgefüllten Verbindungsschlitze der Trennkammern ist die Verbindung zwischen der Gelschicht und dem Puffer gewährleistet. Als Puffer diente 0,05 M Veronal-Natriumphosphat-Puffer mit dem pH 8,2. Die Trennung erfolgte während 180 Minuten bei einer Netzspannung von 120 V (Netzgerät Typ II), die einer elektrischen Feldstärke von 10 V/cm und einer Stromstärke von 40 mA entspricht.

Nach der Elektrophorese wurde die Gelschicht mit etwa 20 ml Eisessig, der mit 40 ml Essigsäure, 100 ml Glycerin und 1860 ml aqua dest. hergestellt wurde, übergossen und 30 Minuten fixiert. Nach Abgießen des Eisessigs und Abspülen der Gelschicht mit aqua dest. wurden die Platten aus der Trennkammer herausgeschnitten, mit feuchtem Filterpapier bedeckt und bei Raumtemperatur an der Luft getrocknet.

Färbung:

Die Lipide wurden mit einer Sudanschwarzlösung zwei Stunden mit der getrockneten Gelschicht nach oben gefärbt. Zur Herstellung dieser Lösung wurde 1 g Sudanschwarz in 1 Liter 60 %igem Äthanol, dem 0,5 ml 1 n NaOH zugesetzt worden waren, gelöst.

Die von Lipoproteinen freien Teile der Gelschicht wurden danach durch vorsichtige Schwenkbewegungen der Platte in 60 %igem Äthanol 20 Sekunden lang entfärbt. An der Luft wurden die Agarose-Gel-Schichten schnell trocken.

3. Statistik:

Die Plasmaproben aller Patienten wurden in Doppelbestimmungen analysiert.

Die bei der Gesamtcholesterin-, Triglycerid- und Phosphatidbestimmung gemessenen Werte für die Proben der 8 Patienten wurden wie folgt arithmetisch gemittelt ($\bar{x}$) über:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}, \quad (n = 8)$$

Die Standardabweichung (S_E), das ist die mittlere quadratische Abweichung der Einzelwerte, wurde errechnet aus:

$$S_E = \frac{\sum_{i=1}^n (x - x_i)^2}{n - 1} , (n = 8)$$

Aus der Verwendung von Plasmaproben unterschiedlicher Hyperlipidämien resultieren die zum Teil hohen Standardabweichungen.

Der Fehler des Mittelwertes (S_M), d.h. die Streuung der Mittelwerte, ergab sich aus:

$$S_M = \frac{S_E}{n} , (n = 8)$$

Zur Prüfung, ob sich durch die verschiedenen Lagerungsbedingungen eine Veränderung gegenüber dem Ausgangswert (Sofortbestimmung) ergeben hat, wurde der t-Test, der Test für abhängige Stichproben angewendet. Bei diesem t-Test wurden jeweils die beiden Meßwerte, die zu einem Probanden gehören, einander zugeordnet und ihre Differenz gebildet. Dadurch werden die starken Schwankungen in den Ausgangswerten kompensiert. Da die Verteilung der gebildeten Differenzen nicht wesentlich von einer Normalverteilung abwich, konnte der t-Test angewendet werden.

Um zu klären, ob der Unterschied als " statistisch gesichert " oder, wie hierbei üblich als " signifikant " zu bezeichnen ist, wurde die sogenannte Nullhypothese benutzt.

Die Nullhypothese geht davon aus, daß zwischen den betrachteten Teilgesamtheiten keine echte Differenz vorhanden ist, sondern die beiden verglichenen Stichproben einer " einheitlichen Grundgesamtheit " entstammen. Sollten trotzdem Unterschiede beobachtet werden, so seien sie rein zufällig. Die Wahrscheinlichkeit, die für diese Annahme spricht wird nun geprüft. Das hieß im vorliegenden Fall, daß der Unterschied zwischen den beiden Meßreihen als signifikant betrachtet werden konnte, wenn die Nullhypothese mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5 % abgelehnt werden konnte. Dagegen bedeutet eine Irrtumswahrscheinlichkeit von mehr als 5 % jedoch nicht, daß zwischen den betrachteten Stichproben kein Unterschied besteht, sondern nur, daß keine Signifikanz gefunden werden konnte. Denn es könnte trotzdem eine signifikante Differenz vorliegen, die aber erst bei umfangreicheren Untersuchungsreihen nachzuweisen wäre.

4. Ergebnisse:

4.1. Gesamtcholesterin

Bei der Aufbewahrung der Plasmaproben im Temperaturbereich unter 0 °C ergab sich, daß im Gesamtplasma und in den einzelnen Gruppen der VLDL, LDL und HDL bei dem Vergleich mit der Sofortbestimmung nach 28 Tagen bei -20 °C der Cholesteringehalt erheblich abnahm. Nach dieser Lagerzeit bei -20 °C war zu verzeichnen ein signifikanter Abfall des Gesamtcholesterins um -9,28 % ($\alpha = 0,04$), ein Absinken in den VLDL um -5,13 % ($\alpha = 1,39$), in den HDL sogar um 10,94 % ($\alpha = 3,69$). Als einzige weitere signifikante Änderung des Cholesteringehaltes konnte im Gesamtplasma und in der HDL-Fraktion nach Einfrieren und sofortigem Auftauen eine Verringerung um -3,77 % ($\alpha = 1,10$) bzw. um -14,31 % ($\alpha = 1,66$) verzeichnet werden. Im Gegensatz zu den

beschriebenen Veränderungen des Cholesteringehaltes bei einer vierwöchigen Aufbewahrung des Plasmas bei -20°C zeigte eine 28-tägige Lagerung bei -60°C nur unwesentliche Schwankungen der Werte.

4.2. Triglyceride

Die Triglyceride im Gesamtplasma wiesen unter der Lagerbedingung " Einfrieren/Auftauen " einen signifikanten Abfall von $-3,10\%$ ($\alpha = 3,08$) auf, zeigten dagegen nach 28 Tagen bei -20°C ein Ansteigen um $+3,98\%$ ($\alpha = 0,11$).

In der Fraktion der VLDL ergab sich analog zum Gesamtplasma unter der Bedingung " Einfrieren/Auftauen " eine Verringerung um $-4,16\%$ ($\alpha = 0,46$) und bei der Lagerzeit von 28 Tagen bei -20°C ein Ansteigen um $+9,35\%$ ($\alpha = 0,21$). Zusätzlich konnte im Gesamtplasma nach 28 Tagen bei -60°C eine Zunahme von $+5,92\%$ ($\alpha = 1,72$) verzeichnet werden.

Bei den LDL konnte kein signifikantes Ansteigen oder Absinken der Triglyceride gemessen werden.

Im Gegensatz zu den Tendenzen, die sich bei der Untersuchung des Gesamtplasmas und der VLDL gezeigt haben, wiesen die HDL folgende Signifikanzen auf: eine Zunahme um $+2,02\%$ ($\alpha = 4,8$) bei der Bedingung " Einfrieren/Auftauen ", sowie einen erheblichen Abfall um $-8,63\%$ ($\alpha = 0,04$) nach 4 Wochen bei -20°C und um $-6,46\%$ ($\alpha = 0,44$) nach 28 Tagen bei -60°C .

4.3. Phosphatide

Bei der Untersuchung auf Gehalt an Phosphatiden konnten im Gesamtplasma signifikante Verminderungen um $-3,10\%$ ($\alpha = 1,01$) nach 28 Tagen bei -20°C und um $-2,76\%$ ($\alpha = 2,43$) nach 4 Wochen bei -60°C gemessen werden.

In der Gruppe der VLDL konnte ebenfalls eine signifikante

Verringerung gegenüber dem Sofortwert nachgewiesen werden, nämlich von -5,22 % ($\alpha = 4,77$) bei vierwöchiger Lagerung bei -20 °C und von -5,16 % ($\alpha = 3,97$) bei -60 °C.

Noch stärker vermindert sich der Phosphatidgehalt der LDL, nämlich um -11,84 % ($\alpha = 0,03$) bei -20 °C und um -11,86 % ($\alpha = 0,02$) bei -60 °C.

Im Gegensatz zu diesem Abfall nahmen die Phosphatide in der Gruppe der HDL bei den gleichen Lagerbedingungen unerwartet stark zu: bei -20 °C war ein Anstieg von +17,03 % ($\alpha = 0,03$) und bei -60 °C sogar von +23,90 % ($\alpha = 0,25$) zu verzeichnen.

	Lager- bedin- gung in	$\bar{x}$ Mittel- werte in	S_E	S_M	Verän- derung nach Lagern	α
	Tage/ °C	$\frac{\text{mg}}{100 \text{ ml}}$			in %	
Gesamt- plasma	sofort	296,31	73,20	25,88		
	einfrieren u. auftauen	285,14	71,57	25,30	- 3,77	1,10
	28/ -20 °C	268,81	70,03	24,76	- 9,28	0,04
	28/ -60 °C	290,50	66,72	23,59	- 1,96	22,82
VLDL	sofort	91,00	65,94	23,31		
	einfrieren u. auftauen	90,79	68,12	24,09	- 0,23	92,23
	28/ -20 °C	86,33	63,08	22,30	- 5,13	1,39
	28/ -60 °C	94,20	61,68	21,81	+ 3,52	27,33
LDL	sofort	144,64	37,46	13,24		
	einfrieren u. auftauen	144,10	39,96	14,13	- 0,37	83,34
	28/ -20 °C	131,84	35,27	12,47	- 8,85	0,01
	28/ -60 °C	141,19	36,45	12,89	- 2,39	5,28
HDL	sofort	45,99	11,34	4,00		
	einfrieren u. auftauen	39,41	14,22	5,03	-14,31	1,66
	28/ -20 °C	40,96	7,98	2,82	-10,94	3,69
	28/ -60 °C	46,77	8,55	3,02	+ 1,70	77,23

Tabelle I zur Gesamtcholesterinbestimmung

Für Gesamtplasma und Lipoproteinfraktionen die Mittelwerte $\bar{x}$ mit Standardabweichung S_E , Mittelwertstreuung S_M und die Veränderung gegenüber dem Sofortwert in % mit Angabe der Signifikanz unter den einzelnen Lagerbedingungen.

	Lager- bedin- gung in	$\bar{x}$ Mittel- werte in	S_E	S_M	Verän- derung nach Lagern	α
	Tage/ $^{\circ}C$	$\frac{mg}{100\ ml}$			in %	
Gesamt- plasma	sofort	350,37	188,80	66,75		
	einfrieren u. auftauen	339,52	182,72	64,60	- 3,10	3,08
	28/ -20 $^{\circ}C$	364,31	188,79	66,75	+ 3,98	0,11
	28/ -60 $^{\circ}C$	353,35	184,78	65,33	+ 0,85	29,92
VLDL	sofort	179,96	98,80	34,93		
	einfrieren u. auftauen	172,47	100,61	35,57	- 4,16	0,46
	28/ -20 $^{\circ}C$	196,79	101,83	36,00	+ 9,35	0,21
	28/ -60 $^{\circ}C$	190,61	102,36	36,19	+ 5,92	1,72
LDL	sofort	95,45	58,55	20,70		
	einfrieren u. auftauen	93,92	60,18	21,28	- 1,60	33,78
	28/ -20 $^{\circ}C$	93,69	59,67	21,10	- 1,84	25,84
	28/ -60 $^{\circ}C$	95,20	60,60	21,43	- 0,26	86,19
HDL	sofort	56,32	22,08	7,81		
	einfrieren u. auftauen	57,46	22,57	7,98	+ 2,02	4,80
	28/ -20 $^{\circ}C$	51,46	20,80	7,35	- 8,63	0,04
	28/ -60 $^{\circ}C$	52,68	20,48	7,24	- 6,46	0,44

Tabelle II zur Triglyceridbestimmung

Für Gesamtplasma und Lipoproteinfraktionen die Mittelwerte $\bar{x}$ mit Standardabweichung S_E , Mittelwertstreuung S_M und die Veränderung gegenüber dem Sofortwert in % mit Angabe der Signifikanz unter den einzelnen Lagerbedingungen.

Lager- bedin- gung in	$\bar{x}$ Mittel- werte in	S_E	S_M	Verän- derung nach Lagern	α
Tage/ $^{\circ}\text{C}$	$\frac{\text{mg}}{100 \text{ ml}}$			in %	
Gesamt- plasma	sofort	309,11	86,93	30,73	
	einfrieren u. auftauen	310,10	87,54	30,95	+ 0,32 72,73
	28/ -20 $^{\circ}\text{C}$	299,54	81,76	28,91	- 3,10 1,01
	28/ -60 $^{\circ}\text{C}$	300,59	83,00	29,35	- 2,76 2,43
VLDL	sofort	85,03	54,83	19,38	
	einfrieren u. auftauen	86,24	55,81	19,73	+ 1,43 9,69
	28/ -20 $^{\circ}\text{C}$	80,59	56,20	19,87	- 5,22 4,77
	28/ -60 $^{\circ}\text{C}$	80,64	56,34	19,92	- 5,16 3,97
LDL	sofort	103,39	29,75	10,52	
	einfrieren u. auftauen	104,43	30,74	10,87	+ 1,00 23,51
	28/ -20 $^{\circ}\text{C}$	91,15	27,75	9,81	-11,84 0,03
	28/ -60 $^{\circ}\text{C}$	91,13	28,33	10,01	-11,86 0,02
HDL	sofort	79,33	5,82	2,06	
	einfrieren u. auftauen	83,38	9,38	3,32	+ 5,11 10,34
	28/ -20 $^{\circ}\text{C}$	92,84	9,52	3,37	+17,03 0,03
	28/ -60 $^{\circ}\text{C}$	98,32	15,04	5,32	+23,94 0,25

Tabelle III zur Phosphatidbestimmung

Für Gesamtplasma und Lipoproteinfractionen die Mittelwerte $\bar{x}$ mit Standardabweichung S_E , Mittelwertstreuung S_M und die Veränderung gegenüber dem Sofortwert in % mit Angabe der Signifikanz unter den einzelnen Lagerbedingungen.

4.4. Lipoproteinelektrophorese

Bei der Auswertung der 128 durchgeführten Lipoproteinelektrophoresen konnte festgestellt werden, daß sich die Lipoproteinemuster der Plasmaproben bei der Lagerung unter 0 °C verändern.

Besonders die prä- β -Lipoproteine (VLDL) wiesen nach Ablauf der 28-tägigen Lagerung bei -20 °C und -60 °C im Vergleich zur Sofortuntersuchung keine einheitlichen Banden mehr auf, sondern zeigten eine deutliche Subfraktionierung in zwei Banden.

Die Banden der Lipoproteinfraktionen der β -Lipoproteine (LDL) und der α -Lipoproteine (HDL) lassen eine Änderung der elektrophoretischen Mobilität nach vierwöchiger Lagerung bei -20 °C und -60 °C erkennen.

Die Abbildungen 4 a-d, 5 a-d und 6 a-d zeigen die bei den Untersuchungen erhaltenen Banden für die Sofortbestimmung und die Lagerbedingungen " Einfrieren/Auftauen " und 28 Tage bei -20 °C für das Gesamtplasma sowie für die Fraktionen VLDL, LDL und HDL.

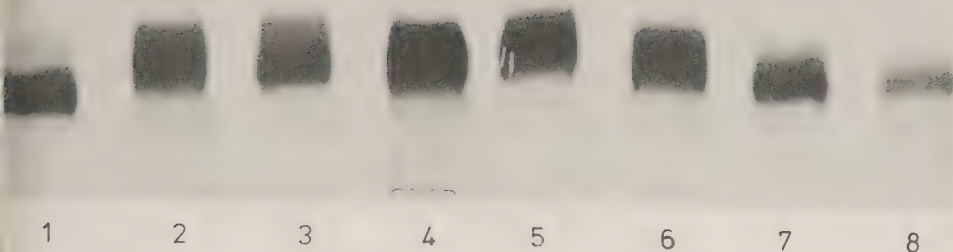


Abb. 4 a: Elektrophorese des Gesamtplasmas
von 8 Patienten, durchgeführt sofort
nach Plasmagewinnung.

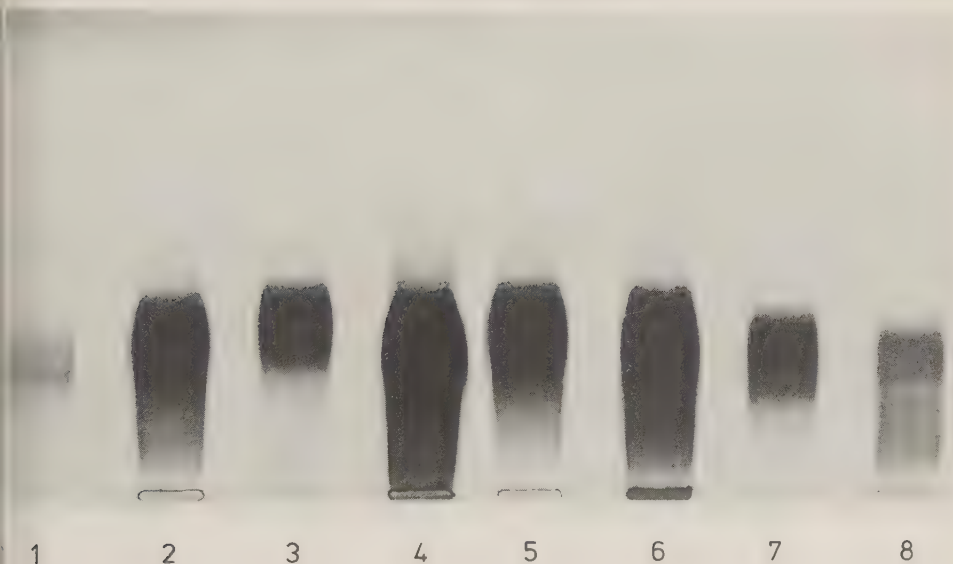


Abb. 4 b: Elektrophorese der VLDL - Fraktion
von 8 Patienten, durchgeführt sofort
nach Plasmagewinnung.

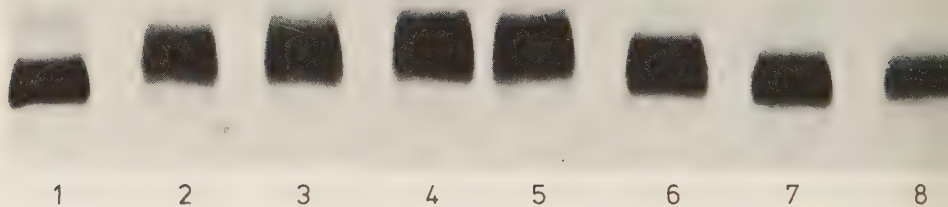


Abb. 4 c: Elektrophorese der LDL - Fraktion
von 8 Patienten, durchgeführt sofort
nach Plasmagewinnung.

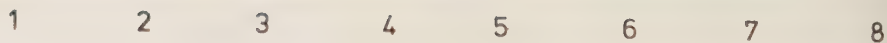


Abb. 4 d: Elektrophorese der HDL - Fraktion
von 8 Patienten, durchgeführt sofort
nach Plasmagewinnung.

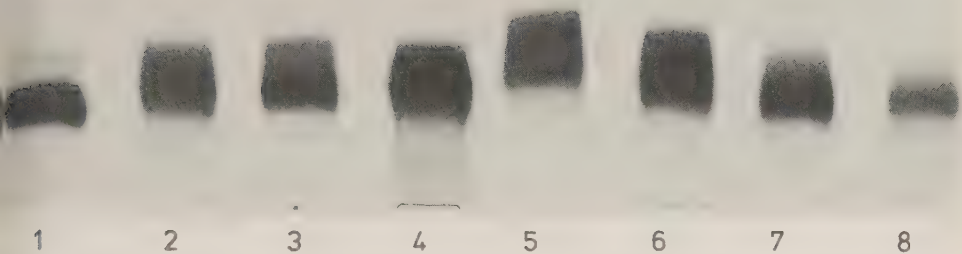


Abb. 5 a: Elektrophorese des Gesamtplasmas
von 8 Patienten, durchgeführt nach
der Lagerbedingung " Einfrieren/Auftauen ".

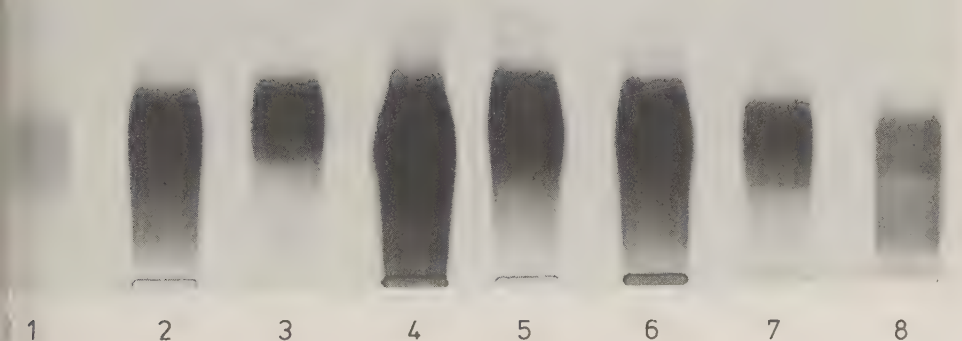


Abb. 5 b: Elektrophorese der VLDL - Fraktion
von 8 Patienten, durchgeführt nach
der Lagerbedingung " Einfrieren/Auftauen ".

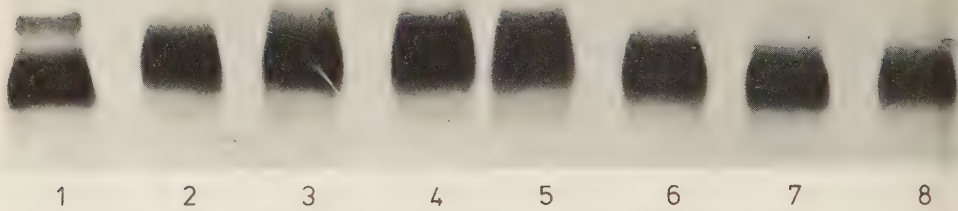
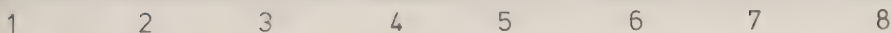


Abb. 5 c: Elektrophorese der LDL - Fraktion
von 8 Patienten, durchgeführt nach
der Lagerbedingung " Einfrieren/Auftauen ".

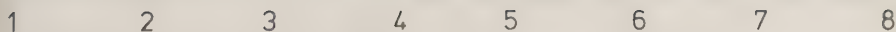
1 2 3 4 5 6 7 8

Abb. 5 d: Elektrophorese der HDL - Fraktion
von 8 Patienten, durchgeführt nach
der Lagerbedingung " Einfrieren/Auftauen ".



1 2 3 4 5 6 7 8

Abb. 6 a: Elektrophorese des Gesamtplasmas
von 8 Patienten, durchgeführt nach
28-tägiger Lagerung bei -20°C .



1 2 3 4 5 6 7 8

Abb. 6 b: Elektrophorese der VLDL - Fraktion
von 8 Patienten, durchgeführt nach
28-tägiger Lagerung bei -20°C .

1 2 3 4 5 6 7 8

Abb. 6 c: Elektrophorese der LDL - Fraktion
von 8 Patienten, durchgeführt nach
28-tägiger Lagerung bei -20°C .

1 2 3 4 5 6 7 8

Abb. 6 d: Elektrophorese der HDL - Fraktion
von 8 Patienten, durchgeführt nach
28-tägiger Lagerung bei -20°C .

5. Diskussion

Im Rahmen der Marburger Arbeitsgruppe untersuchten O. MÜHLLFELLNER et al. (25) das Verhalten der Blutlipide unter verschiedenen Lagerungsbedingungen. Im Vergleich dazu wurde in dieser Arbeit das Blutplasma in die dichtemäßig unterschiedlichen Lipoproteinfractionen VLDL, LDL und HDL mittels der präparativen Ultrazentrifuge zerlegt und der Einfluß unterschiedlicher Lagerzeiten und Temperaturen auf die Stabilität der einzelnen Blutlipide in diesen Lipoproteingruppen überprüft.

Aus diagnostischen und wissenschaftlichen Gründen müssen Plasmaproben immer häufiger unter wechselnden Bedingungen verschickt oder vor der weiteren Verarbeitung gelagert werden. Es sollte daher festgestellt werden, ob nach einer bestimmten Aufbewahrungszeit noch die exakte Bestimmung der Konzentration der Blutlipide in den einzelnen Lipoproteinfractionen möglich ist. Die vorgenommenen 128 Lipoproteinelektrophoresen sollten die Kontrolle darüber ermöglichen, ob die Fraktionierung des Blutplasmas in die drei verschiedenen Dichteklassen mit der präparativen Ultrazentrifuge korrekt durchgeführt wurde und ob sich die Lipoproteinemuster und damit ihre elektrophoretische Mobilität nach den erwähnten Lagerbedingungen ändern.

Aus der Literatur sind uns nur wenige Arbeiten bekannt, die sich mit dem Verhalten der Blutlipide bei unterschiedlichen Aufbewahrungsbedingungen befassen. Nach Untersuchungen, in denen Plasmaproben mittels Ultrazentrifugation in VLDL, LDL und HDL aufgetrennt, ihre Stabilität gemessen und die Lipidkonzentration quantitativ bestimmt wurden, haben wir in den Veröffentlichungen seit 1965 vergeblich gesucht. L.WALFORTH et al. (32) stellten nach 6 Monaten bei eingefrorenem Plasma keine Veränderung des Gesamtcholesteringehaltes fest. Auch O. MÜHLLFELLNER

et al. (25) fanden in ihren Untersuchungen, daß sich nach 4 Wochen Lagerung bei -20°C die Cholesterine, Triglyceride und Phosphatide nicht signifikant änderten. GOTTFRIED et al. (14) untersuchten elektrophoretisch Seren von Patienten, die teils an Arteriosklerose oder Hyperlipidämien litten, teils unveränderte Blutwerte aufwiesen, und fanden, daß sich die Gruppe der LDL schon bei Raumtemperatur oder tiefgefroren nach 1-tägiger Lagerung um 10 %, nach 2 Tagen um 20 % und nach 3 Tagen um 25 % verringerten. Im Gegensatz dazu gaben FREDRICKSON et al. (13) an, daß die LDL über mehrere Monate bei $+2^{\circ}\text{C}$ bis $+4^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt werden können, ohne Veränderungen zu zeigen. ZÖLLNER et al. (36) wiesen darauf hin, daß bereits eine Aufbewahrung von Plasmaproben bei $+4^{\circ}\text{C}$ rasch zu einer Veränderung der Lipoproteinstmuster führe. Daher war es von Interesse zu wissen, ob die Lagerung von Plasma bei Temperaturen unter 0°C ebenfalls das Lipoproteinstmuster verändert. Bei den vorliegenden Untersuchungen des Plasmas von 8 Patienten mit unterschiedlichen Hyperlipidämien konnten signifikante Veränderungen des Lipidgehaltes der mittels der präparativen Ultrazentrifuge gewonnenen Lipoproteingruppen gefunden werden.

Nach vierwöchiger Lagerzeit bei -20°C ergaben die Messungen eine signifikante Verringerung der Gesamtcholesterinkonzentration im Plasma, die in ihrer Tendenz der Abnahme bei 0. MÜHLLFELLNER et al. (25) entspricht. Die VLDL wiesen nach gleicher Lagerung um -5,13 % verminderte Cholesterinwerte auf, während in den LDL ein Abfall von -8,85 % und in den HDL sogar um -10,94 % registriert werden konnte. Der Gesamtcholesteringehalt in den HDL sank nach kurzfristigem Einfrieren bei -10°C und anschließendem Auftauen bei Zimmertemperatur um -14,31 % signifikant ab (siehe Tab. 1).

O. MÜHLFELLNER et al. (25) stellten bei ihren Untersuchungen über Plasmalagerung im negativen Temperaturbereich eine statistisch nicht gesicherte Zunahme der Triglyceride im Gesamtplasma fest. Bei den von uns vorgenommenen Überprüfungen der Triglyceridkonzentration des Gesamtplasmas fanden wir nach den genannten Lagerbedingungen die gleiche Tendenz zur Erhöhung, die in unserem Fall signifikant war.

Weiterhin konnte festgestellt werden, daß der Triglyceridgehalt der VLDL nach " Einfrieren und Auftauen " statistisch gesichert abnahm, bei den HDL jedoch anstieg. Eine Zunahme der Triglyceride konnten wir nach vierwöchiger Aufbewahrung bei -20°C bzw. -60°C in den VLDL beobachten, während in den HDL unter gleichen Bedingungen eine wesentliche Verringerung zu verzeichnen war. Die LDL hingegen zeigten unter den durchgeführten Lagerbedingungen eine hohe Stabilität (siehe Tab. 2), ihre Meßwerte wiesen keine signifikanten Veränderungen gegenüber dem Sofortwert auf. Über das Verhalten der Phosphatide im Gesamtplasma unter den verschiedenen Lagerzeiten führten O. MÜHLFELLNER et al. (25) auf, daß nach 4 Wochen bei -20°C keine signifikante Änderung dieser Lipidfraktion nachzuweisen war.

Die von uns durchgeführten Analysen zeigten nach 28-tägigem Aufbewahren bei -20°C bzw. -60°C einen signifikanten Abfall der Phosphatide gegenüber dem Ausgangswert im Gesamtplasma, besonders aber in den Lipoproteinfraktionen VLDL und LDL. Im Gegensatz dazu nahm der Phosphatidgehalt in den HDL bei gleicher Lagerung um erhebliche Prozentwerte zu. Sowohl die Abnahme in den LDL als auch der Anstieg in den HDL war hoch signifikant (α -Werte von 0,02 bis 0,25).

Die Auswertung der von uns durchgeführten Lipoproteinelektrophoresen bewies, daß eine einwandfreie Trennung der Lipoproteingruppen mit der Ultrazentrifuge erfolgte.

Außerdem konnten wir nachweisen, daß sich die Lipoproteinemuster bei Lagerung unter 0 °C verändern.

Nach 28-tägiger Lagerung bei -20 °C wiesen die prä- β -Lipoproteine keine einheitlichen Banden mehr auf, sondern zeigten eine deutliche Subfraktionierung in zwei Banden, die bei -60 °C in gleichem Maße auftrat.

Die Ergebnisse unserer Meßreihen über das Verhalten der Lipide in den Lipoproteinfractionen lassen es ratsam erscheinen, das Plasma zur routinemäßigen oder wissenschaftlichen Diagnose nicht bei Temperaturen im Bereich unter 0 °C zu lagern oder in Tiefkühlbehältern zu verschicken.

Vielmehr beweisen unsere Resultate, daß es empfehlenswert ist, die Ultrazentrifugation des Plasmas zur Bestimmung der Konzentration der Cholesterine, der Triglyceride und der Phosphatide in den Lipoproteinfractionen möglichst unverzüglich vorzunehmen.

Ist eine sofortige Bestimmung des Lipidgehaltes in den Lipoproteinen nicht möglich, so können wir auf die Arbeit von BEHRENS (4) verweisen, der zur Messung des Cholesteringehaltes im Gesamtplasma und in den einzelnen Lipoprotein-Dichteklassen eine Lagerung von 3 bis 7 Tagen im Kühlschrank bei +4 °C für ratsam hält.

Hinsichtlich der Bestimmung der Phosphatide sowie der Triglyceride gibt BEHRENS (4) an, daß Plasmaproben mit gewissen Einschränkungen zumindest über 3 Tage bei +4 °C gelagert und danach noch verwertet werden können. Zur Erzielung genauester Werte hält er ebenfalls die sofortige Untersuchung des Plasmas für angezeigt.

Die Aufbewahrung von Plasmaproben über einen längeren Zeitraum bei -20 °C bzw. -60 °C zum Zweck der elektrophoretischen

Diagnose bestimmter Dislipidämien erscheint uns als nicht empfehlenswert, da unsere Auswertung der elektrophoretisch getrennten Banden der einzelnen Lipoproteinfractionen beweisen, daß sich die Lipoproteinemuster der prä- β -Lipoproteine ändern. Diese Veränderungen können daher unter Umständen zu Fehlinterpretationen der Lipoproteinelektrophorese führen.

6. Zusammenfassung

Die Plasmaproben von 8 Patienten wurden in 768 Untersuchungen mit der Ultrazentrifuge in die einzelnen Lipoproteinfractionen VLDL, LDL und HDL getrennt und in Doppelbestimmungen zur Verringerung der Fehlerbreite analysiert. In diesen Gruppen, sowie im Gesamtplasma konnten Veränderungen der Blutlipide nach Einfrieren und Wiederauftauen als auch nach vierwöchiger Lagerung bei -20°C bzw. -60°C bewiesen werden. Zur Kontrolle der exakten Fraktionierung der Lipoproteine wurden die untersuchten Proben in die Lipoproteinelektrophorese eingesetzt. Es zeigte sich, daß die Verschickung oder Lagerung im Temperaturbereich unter 0°C vor der Weiterverarbeitung in der Ultrazentrifuge nicht empfohlen werden kann, wenn eine genaue Untersuchung der Blutlipidkonzentration im Gesamtplasma als auch in den einzelnen Lipoproteinen durchgeführt werden soll, da sich ihre elektrophoretische Mobilität ändert. Vielmehr erscheint es ratsam, die Bestimmung möglichst unverzüglich vorzunehmen. Sollte dies nicht möglich sein, so bietet sich die Lagerung bzw. Verschickung zu den Bedingungen an, die BEHRENS (4) für am besten geeignet hält. BEHRENS hält aufgrund seiner Untersuchungen eine Lagerung über 3 Tage bei $+4^{\circ}\text{C}$ für noch vertretbar.

- 12 FREDRICKSON, D.S. A system for phenotyping hyperlipoproteinemia.
Circulation 31, 321 (1965)
- 13 FREDRICKSON, D.S. Fat transport in lipoproteins -
LEVY, R.I. an integrated approach to
LEES, R.S. mechanisms and disorders.
New Engl. J. Med. 276,
34, 94, 148, 215, 273 (1967)
- 14 GOTTFRIED, S.P. Serum beta-lipoproteins of
POPE, R.H. normal, arteriosclerotic, and
FRIEDMANN, N.H. lipemic individuals.
AKERSON, I.B. Clin. Chem. 1, 253 (1955)
DI MAURO, S.
- 15 HAVEL, R.J. The distribution and chemical
EDER, H.A. composition of ultracentrifugally
BRAGDON, J.H. separated lipoproteins in human
serum.
J. Clin. Invest. 34, 1345 (1955)
- 16 HOEFLMAYR, J. Erkennung von Fettstoffwechsel-
FRIED, R. störungen, I. Mitteilung:
Gesamtlipide im Serum.
Med. Klin. 62, 1323 (1967)
- 17 HOEFLMAYR, J. Einige Probleme der Hypercholeste-
rinämie.
Ärztl. Praxis 26, 1604 (1963)
- 18 JAHNKE, K. Die Bluteiweißkörper in der Ultra-
SCHOLTAN, W. zentrifuge, Sedimentation-Flota-
tion.
G. Thieme Verlag - Stuttgart
S. 120 (1960)
- 19 KAHLKE, W. Pathologische Muster von Serumli-
RAPP, W. poproteinen, dargestellt mit einer
neuen Methode der Lipoprotein-
Elektrophorese.
Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 73,
829 (1967)
- 20 KAHLKE, W. Elektrophoretische Auftrennung
der Lipoproteine des Serums.
Ärztl. Lab. 14, 495 (1968)
- 21 KAHLKE, W. Lipoprotein-patterns in primary
SCHLIERF, G. hyperlipidemias, as registered
PAPENBERG, J. by Agarose gel electrophoresis,
in: Drugs affecting lipid Meta-
bolism.
Plenum Press 1969, S. 621
- 22 KLEMENS, U.H. Lipoprotein-Elektrophorese auf
SCHMALBECK, J. Cellulose-Acetat-Membranen.
Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 7,
540 (1969)

- 23 LIEBERMANN, C. Über das Oxychinoterpen.
Ber. Dtsch. chem. Ges. 18, 1803
(1885)
- 24 MÜHLFELLNER, O. Über die Haltbarkeit von Plasma-
lipiden unter verschiedenen Lage-
rungsbedingungen.
Inaug. Diss. Marburg 1969
- 25 MÜHLFELLNER, O. Über die Haltbarkeit von Plasma-
MÜHLFELLNER, G. proteinen unter verschiedenen
ZÖFEL, P. Lagerungsbedingungen.
KAFFARNIK, H. Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
10, 37 (1972)
- 26 PETZOLD, F.A. Lipide und Lipoproteine im Blut-
plasma.
Springer Verlag, Berlin-Göttingen-
Heidelberg, 1961
- 27 RICHTERLICH, R. Bestimmung des Gesamtcholesterins
LAUBER, K. im Serum, VIII. Mitteilung über
Ultramikromethoden im klinischen
Laboratorium.
Klin. Wschr. 40, 1252 (1962)
- 28 SCHETTLER, G. Arteriosklerose und Cholesterin-
stoffwechsel.
Dtsch. Med. Wschr. 27/28, 989
(1953)
- 29 SCHLIERF, G. Ärztl. Fortbgd. 16, 126 (1966)
- 30 SCHMIDT, F.H. Zur Methode der enzymatischen
von DAHL, K. Neutralfettbestimmung in biolo-
gischem Material.
Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
6, 156 (1968)
- 31 SEIDEL, D. Plasmalipoproteine.
Biochem. u. klin. Aspekte
Münch. Med. Wschr. 115, 15, 613
(1956)
- 32 WALFORD, L. Amer. J. Clin. Path. 26, 376
SOWA, M. (1956)
DALEY, D.
- 33 WATSON, D. A simple Method for the determi-
nation of serum cholesterol.
Clin. Chem. Acta 5, 637 (1960)
Amsterdam
- 34 WIELAND, H. Plasmalipoproteine bei Patienten
SEIDEL, D. mit Hyperthyreose: Isolierung und
Charakterisierung eines abnormen
High-density-Lipoproteins.
Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
10, 311 (1972)

- 35 WINKELMANN, J.
WYBENGA, D.R.
IBBOTT, F.A.
Phenotyping of hyperlipoproteinemias, effect on electrophoretic pattern of serum storage at ambient, refrigerator, or freezing temperatures.
Clin. Chem. 16, 507 (1970)
- 36 ZÖLLNER, N.
GRÖBNER, W.
BERGER, C.
WOLFRAM, G.
Elektrophoretische Trennung der Serumlipoproteine in Agarose gel mit Albuminzusatz.
Z. klin. Chem. u. Biochem. 7, 525
(1969)

Herrn Prof. Dr. H. Kaffarnik danke ich für die Möglichkeit der wissenschaftlichen Arbeit an der Medizinischen Poliklinik der Universität Marburg, gleichzeitig möchte ich ihm besonderen Dank für die Überlassung des Themas sowie für seine freundliche Unterstützung aussprechen. Außerdem danke ich auch Herrn Priv. Doz. Dr. J. Schneider für seine hilfreichen Hinweise zur Durchführung dieser Arbeit.

Ebenso möchte ich danken Herrn und Frau Drs. Mühlfellner für ihre Mithilfe während der Blutabnahme sowie Herrn Diplom-Mathematiker P. Zöfel vom Rechenzentrum der Universität Marburg für die statische Bearbeitung der Ergebnisse.

Lebenslauf

Am 13. August 1940 wurde ich als Sohn des Justizamtmanns Wilfried Sperling und dessen Ehefrau Hedwig, geb. Markowsky, in Magdeburg/Kr. Magdeburg geboren.

Im Jahre 1946 wurden meine Mutter und ich nach Schöppenstein/Kr. Wolfenbüttel evakuiert, wohin mein Vater aus der Kriegsgefangenschaft entlassen worden war.

Von Ostern 1947 bis Ostern 1951 besuchte ich die dortige Grundschule und danach für 1 Jahr die Realschule.

Nach unserem Umzug 1952 nach Schöningen/Kr. Helmstedt besuchte ich dort von Ostern 1952 an das Gymnasium Anna-Sophianeum, an dem ich im Februar 1962 im neusprachlichen Zweig die Reifeprüfung ablegte.

Von April 1962 bis März 1968 war ich als Zeitoffizier bei der Luftwaffe der Bundeswehr.

Im Sommersemester 1968 begann ich an der Philipps-Universität in Marburg das Studium der Naturwissenschaften. Zum Wintersemester 1969 wechselte ich in die Fakultät der Zahnheilkunde über und legte dort im Februar 1970 die naturwissenschaftliche Vorprüfung ab.

Die zahnärztliche Vorprüfung bestand ich im Februar 1973 und beendete mein Studium im Dezember 1975 mit dem Staatsexamen.

Nach einer mehrmonatigen Assistenzzeit in einer Zahnarztpraxis begann ich im August 1976 meine Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Zahnklinik der Philipps-Universität in Marburg.

Meine akademischen Lehrer waren die Professoren
und Dozenten:

Amon	Lüdtke
Aurich	Maroske
Aziz	Niemeyer
Bernd	Nöth
Bernhardt	Petry
Bode	Pfütz
Castenholz	Portig
Denicke	Rohen
Dimroth	Rosemann
Friedrich	Rupec
Gerdes	Schachtschabel
Golenhofen	Schienbein
Haberich	Schiff
Hennis	Schmidt
Hensel	Schmitz-Moormann
Hering	Schneider
Heuser	Schnell
Hort	Seidel
Janke	Sekeris
Karlson	Spröggel
Kleinsasser	Stuke
Koecke	Walcher
Koransky	Wesemann
Lange	Wolter

